

**Université d'Auvergne**  
**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**N° d'ordre : 9-DOC**

**Thèse**  
**pour obtenir le grade de**  
**DOCTEUR D'UNIVERSITE**  
**Spécialité : Histopathologie et Génétique moléculaire**

**Présentée et soutenue publiquement par**  
**CHENE Gautier**  
**le 14 juin 2011**

**LES DYSPLASIES TUBO-OVARIENNES :**  
**CONTRIBUTION A UNE MEILLEURE**  
**COMPREHENSION DE LA**  
**CARCINOGENESE OVARIENNE**

**Directeur de la thèse :**

**Pr. Penault-Llorca Frédérique**

**Membres du jury :**

**Pr. Dauplat Jacques**

**Pr. Devouassoux-Shisheboran Mojgan**

**Pr. Mage Gérard**

**Pr. Seffert Pierre**

**Dr Ray-Coquard Isabelle**



**Il faut viser la lune car, même en cas d'échec, on atterrit toujours dans les étoiles** □ **Oscar Wilde**

## **Remerciements :**

Je voudrais tout d'abord remercier très chaleureusement le Professeur Frédérique Penault-Llorca de m'avoir proposé ce sujet passionnant et d'avoir su m'encadrer. Merci pour son enthousiasme communicatif, sa patience, son écoute, et la confiance qu'elle m'a accordée. Je suis admiratif de son expertise scientifique. Travailler à ses côtés a été un réel plaisir et j'espère pouvoir continuer à l'avenir de travailler avec elle.

Je remercie également le Professeur Jacques Dauplat pour son soutien de tous les instants et de m'avoir proposé initialement cette thématique porteuse. Notre entente aussi bien scientifique qu'humaine a rendu ces années de recherche fort agréables. Merci encore et j'espère que nous poursuivrons cette collaboration amicale et scientifique.

Je remercie également le Professeur Pierre Seffert qui m'a accueilli à Saint Etienne et accordé sa confiance. Travailler à ses côtés est un réel plaisir.

Je tiens également à remercier le Professeur Mojgan Devouassoux-Shisheboran et le Docteur Isabelle Ray-Coquard, pour leurs expertises dans le domaine de la cancérologie ovarienne et d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie aussi le professeur Gérard Mage d'avoir accepté de participer à mon jury de Thèse. Vous m'avez appris la coelio-chirurgie et la rigueur chirurgicale. C'est un plaisir de vous retrouver lors de cette soutenance.

Je remercie tout particulièrement le professeur Philippe Vago qui m'a accueilli dans son service et permis de réaliser la partie moléculaire de ce travail.

Je remercie chaleureusement le Professeur Andréi Tchirkov pour sa vision scientifique et son expertise dans le champ de la biologie moléculaire. J'espère que nous pourrons poursuivre ce travail avec l'étude des télomérases.

Un remerciement immense à Léo dont la patience, la gentillesse et la compétence m'ont permis de mener à bien les études moléculaires en CGH. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés. Un énorme merci !

Un merci tout aussi énorme à Inès et Anne pour leur aide inestimable en anatomopathologie et leur écoute. Merci vraiment pour votre gentillesse et votre expertise.

Je remercie aussi l'ensemble du service d'histopathologie du Centre Jean Perrin et tout particulièrement Christiane pour son aide pour la partie immunohistochimique, sa rapidité dans les manips et sa bonne humeur.

Je remercie également le CICS et tout particulièrement Lorraine pour la microdissection. Merci pour ta patience dans la difficile mise au point de cette technologie.

Merci aussi à toute l'équipe du service de Cytogénétique pour leur accueil, leur disponibilité et leur aide dans ce travail. Un petit message tout particulier à Laetitia et Farida : merci pour votre bonne humeur et votre soutien.

Je remercie le Professeur Nicole Lagarde pour son intérêt et son aide dans ce travail.

Merci également au Professeur Bruno Aublet-Cuvelier et à Patricia Jaffeux pour leur aide statistique. Patricia, c'est toujours un plaisir de travailler avec toi.

Merci également au Professeur Pierre Déchelotte, au Professeur Jean-Luc Pouly et au Docteur Guillaume Le Bouëdec pour leurs conseils lors de ma Thèse de Médecine : ce travail est la suite des premiers résultats de ma thèse d'exercice

Merci également au Professeur Michel Canis et à Catherine Lasnier pour leur confiance et leur rigueur. La génétique moléculaire de l'endométriose n'est pas tellement éloignée des dysplasies (cf télomérases)

Au Professeur Maurice-Antoine Bruhat dont la carrière exceptionnelle est un exemple.

Au Professeur Diane Provencher et à ma future équipe canadienne : que notre collaboration soit fructueuse !

Je remercie évidemment toutes les patientes qui ont accepté que leurs ovaires soient étudiés à des fins scientifiques et j'espère que ce travail pourra apporter une petite contribution à une meilleure compréhension du cancer de l'ovaire

A ma famille

A mes trois amours, merci pour votre patience durant ces années de travail : vous êtes tout pour moi...

A mes parents, Vous m'avez transmis la passion de la médecine et la volonté de toujours progresser, voire de me dépasser. Je sais que je pourrai toujours compter sur vous et sur le lien indéfectible qui nous unit...

A ma belle- famille, Nicole et Jean-Claude : merci pour votre accueil toujours chaleureux...

A Corinne, Delphine, Alban, Thibaut, Claude-Marie, Annie et mes deux oncles préférés Alain : je vous remercie infiniment pour votre gentillesse et votre soutien... Une tendresse toute particulière à mon cousin Alban en raison de nos rapports quasi-fraternels...

A Valentine, Manon, Thomas, mes filleuls, et Antoine : recevez toute mon affection...

A Mamy et Nanou, merci pour votre générosité, votre bonté et votre dynamisme...

A mes fidèles ami(e)s : Nicolas, Olive, Eric, Christophe, Marc, Valérie, Claire, Elise, Julie, Alexandra et Nico, Sébastien, Marion et Thierry, Guillaume et Laetitia...

A l'équipe de l'hôpital Nord :

Aux Gynécos du Service : Marie-Noelle, Bertrand, Ahmad, Anne, Michel, Frédérique, Céline, c'est un plaisir de travailler à vos côtés.

Aux chefs de Clinique : Cécile, Zahir, Charlotte, Emilie, François, Laure, Seb, merci pour votre amitié et votre bonne humeur. Travailler à vos côtés est toujours agréable.

Aux internes : Suzanne, Anne, Thomas, Elodie, Amandine, Tiphaine, Claude-Régis, Cécile, Aurélie x2, Edouard, Marianne, Charlotte : vous êtes des supers internes, ne changez pas !!

A toute l'équipe : Aux sages femmes (je ne cite personne de peur d'oublier un nom ou deux) : vous êtes formidables !

Aux anesthésistes, IDE, IBOD, AP et à mes secrétaires : une équipe soudée !

A Pierre Flori et Hugues Patural : A nos futurs collaborations et merci pour votre amitié

A François Varlet, merci pour votre soutien

Aux différentes équipes de St Chamond, Montbrison, Roanne, Annonay, et Firminy avec lesquelles j'apprécie de travailler

A tous mes amis présents pour la soutenance de ma thèse : merci pour vos encouragements...

A ceux qui sont absents mais qui restent présents dans mon cœur : Loulou, Papy, Armen, Madeleine, Jeannot, Geneviève et Jean André...



## **Les dysplasies tubo-ovariennes : contribution à une meilleure compréhension de la cancérogenèse ovarienne**

**Introduction :** l'analyse histopathologique des pièces d'annexectomie prophylactique (pBSO) pour risque génétique (mutations BRCA) a pu révéler des anomalies cytologiques et architecturales interprétées comme potentiellement pré-cancéreuses et dénommées « dysplasie ovarienne et tubaire ». Nous proposons d'étudier les aspects morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires des dysplasies tubo-ovariennes.

**Matériels & Méthodes :** l'analyse morphologique a été réalisée dans un premier groupe d'annexectomies après stimulation de l'ovulation (protocole de Fécondation in vitro). L'évaluation morphologique et immunohistochimique (expression de Ki67, p53, Bcl2, PAX2 et ALDH1) a par la suite concerné 111pBSO, 42 annexectomies exposées au Tamoxifène et 116 témoins non cancéreux et spontanément fertiles (nBSO). Les analyses ont été réalisées par deux pathologistes en aveugle. Les cellules épithéliales d'intérêt ovariennes et tubaires provenant du groupe pBSO ont été microdisséquées par laser ; l'ADN extrait a été étudié par hybridation génomique comparative (CGH array). La longueur des télomères a été évaluée par PCR quantitative en temps réel.

**Résultats :** les scores moyens de dysplasie ovarienne et tubaire étaient significativement plus élevés dans les groupes stimulation de l'ovulation et génétique par rapport aux témoins. Seul le score de dysplasie tubaire était supérieur aux témoins pour le groupe Tamoxifène. On retrouvait une surexpression de ALDH1 dans les groupes pBSO et tBSO alors que Ki67, p53, bcl2 et PAX2 étaient faiblement exprimés dans les groupes pBSO et tBSO. D'ailleurs, l'expression d'ALDH1 était faible dans l'épithélium non dysplasique, forte dans la dysplasie et constamment faible dans les carcinomes occultes. De subtiles altérations génomiques et des raccourcissements télomériques ont été mis en évidence au niveau des dysplasies génétiques.

**Conclusions :** les scores élevés de dysplasie, la forte expression d'ALDH1 et les altérations moléculaires provenant du groupe à risque génétique pourraient supporter le concept d'instabilité génétique. La dysplasie tubo-ovarienne pourrait être une étape importante et précoce de la cancérogenèse ovarienne. Nos résultats suggèrent également qu'un certain nombre de cancers de l'ovaire pourrait avoir pour origine la trompe de Fallope. Le marqueur de cellules souches ALDH1 pourrait constituer une cible dans la prévention et le diagnostic précoce des cancers de l'ovaire.

**Mots clés:** annexectomie prophylactique; mutation BRCA; cancer de l'ovaire; CGH array; télomère; p53; dysplasie ovarienne; cancérogenèse

## **Ovarian and tubal dysplasia: an early event in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer**

**Background:** Histopathological examination of material from prophylactic salpingo-oophorectomies (pBSO) performed in patients at genetic risk has revealed frequent abnormalities interpreted as possible pre-cancerous “ovarian and tubal dysplasia” lesions. We sought to study the morphologic, immunohistochemical and molecular features in ovarian and tubal dysplasia

**Materials and methods :** Morphologic analysis was evaluated in 37 oophorectomies after ovulation induction (iBSO). Morphologic features and immunohistochemical expression patterns of Ki-67, p53, Bcl2, PAX2 and ALDH1 (an enzyme significantly associated with early-stage ovarian cancer) were evaluated in 111 pBSO, 42 salpingo-oophorectomies exposed with Tamosifen (tBSO) and 116 normal salpingo-oophorectomies (nBSO). Representative slides from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were read blindly by two gynaecological pathologists. Tubal and ovarian epitheliums from normal and dysplastic tissues (from pBSO) were laser microdissected and studied by comparative genomic hybridization (array CGH). Telomere length was performed using quantitative real-time PCR.

**Results:** Mean ovarian and tubal dysplasia score were significantly higher in the ovulation induction group and in the genetic risk group than in controls. Only tubal dysplasia score was significantly higher in the Tamoxifen group. Increased ALDH1 expression was observed in pBSO and tBSO compared with nBSO whereas expression patterns of Ki67, p53, bcl2 and PAX2 were low at moderate in pBSO and tBSO group. Interestingly, ALDH1 expression was low in non dysplastic epithelium, high in dysplasia and constantly low in the carcinoma found incidentally on pBSO. Subtle genomic alterations were found in the dysplastic ovarian and tubal epitheliums. Shortened telomeres were found in dysplastic tissues from pBSO.

**Conclusion:** The increased dysplasia scores, the strong ALDH1 expression and the genetic alterations in ovaries and tubes from BRCA 1/2 carriers could support the genetic instability of dysplasia and might be consistent with progression towards neoplastic transformation and could justify the use of the term “dysplasia”. Ovarian and tubal dysplasia may be a pre-malignant, non-invasive histopathological abnormalitie that could be an important step in

early ovarian neoplasia. Our results suggest that a greater percentage of ovarian cancers than originally thought may actually have a fallopian origin with metastasis to the ovary. The stem cell marker ALDH1 activation in pBSO could be considered as a target for early diagnosis and prevention of ovarian cancers.

**Key words:** prophylactic oophorectomy; BRCA mutation; ovarian cancer; array CGH; telomere; p53; ovarian dysplasia; carcinogenesis

## **Table des Matières**

### **1/ Introduction bibliographique : p15**

- **A : Théories de la cancérogenèse ovarienne : p15**
- **B : Intérêt du modèle d'étude des dysplasies/ cancers à risque génétique : rôle pivot de BRCA p36**
- **C : Concept de lésions pré-cancéreuses : la dysplasie tubo-ovarienne p39**

### **2/ Rationnel de l'étude : p43**

### **3/ Matériel & Méthode : p44**

- **Patientes : p44**
- **Evaluation morphologique : p46**
- **Evaluation immunohistochimique : p47**
- **Microdissection laser : p48**
- **Evaluation moléculaire : p50**

### **4/ Analyses statistiques : p54**

### **5/ Résultats : p55**

- **groupes A vs B : évaluation morphologique et immunohistochimique p55**
- **groupes D vs B : évaluation morphologique et immunohistochimique p57**
- **Groupes C vs B : cf articles (p118)**
- **Evaluation moléculaire p62**

### **6/ Discussion : p67**

- **Evaluation morphologique : p67**
- **Evaluation immunohistochimique : p71**
- **Evaluation moléculaire : p75**

### **7/ Perspectives : p79**

- **télomère et télomérases : p79**

- $\lambda$ H2AX : p84

**8/ Conclusions : p86**

**9/ Bibliographie : p89**

**10/ Iconographie : p104**

**11/Annexes : p111**

**12/ Articles (format pdf) : p118**

## Communications orales :

1/ Dysplasie épithéliale ovarienne après stimulation de l'ovulation. Présentation orale au **congrès européen de PMA à Lyon (ESHRE 2007)**.

Lauréat du 1<sup>er</sup> prix E. Barrère dans le domaine de la PMA et de la Gynécologie, remis officiellement par le Collège National des Gynécologues-Obstétriciens Français CNGOF en déc 2007.

2/ Dysplasie ovarienne : Mythe ou réalité ? Présentation orale au **8<sup>ème</sup> congrès de la Société Européenne de Gynécologie à Paris (SEG 2007)**.

3/ Dysplasie ovarienne et infertilité. Présentation orale au **9<sup>ème</sup> congrès de la Société Européenne de Gynécologie à Paris (SEG 2008)**

4/ La cancérogenèse ovarienne : de la dysplasie au cancer. Présentation orale aux **journées du collège CNGOF**, Paris 2010.

5/ analyse morphologique et immunohistochimique des dysplasies tubo-ovariennes d'origine génétique. Présentation orale **congrès international d'anatomopathologie USCAP**, Washington DC, mars 2010

6/ Cancérogenèse ovarienne & risque génétique. Cours dispensé **l'Ecole de Formation Européenne en Cancérologie EFEC, Institut Curie**, Paris mars 2010 et avril 2011

7/ analyse immunohistochimique et moléculaire des dysplasies tubo-ovariennes d'origine génétique. Présentation orale au **congrès international de Cancérologie Gynécologique IGCS**, Prague, oct 2010

Lauréat du 1<sup>er</sup> prix de la communication orale

8/ Dysplasie tubo-ovarienne. Présentation orale au **congrès national d'anatomopathologie Carrefour de Pathologie**, Paris, nov 2010

## **Introduction :**

Le cancer épithélial de l'ovaire est le plus grave des cancers gynécologiques, avec une survie faible à cinq ans, estimée à 35% tout stade confondu [1]. Véritable « tueur silencieux » en raison d'un diagnostic presque toujours tardif au-delà de toutes ressources thérapeutiques, il est en revanche de bon pronostic lorsqu'il est découvert à un stade précoce (90% au stade IA et 70% au stade II ) [2, 3]. Cependant, notre méconnaissance de la carcinogenèse ovarienne ne permet pas, pour l'instant, d'isoler une phase de latence pré-clinique propice à une attitude interventionnelle préventive.

Plusieurs théories de carcinogenèse ovarienne ont été jusque-là proposées en mettant l'accent sur l'ovaire lui-même et son épithélium de surface aux rôles fonctionnels complexes et doués de propriétés de plasticité et de différenciation. Depuis peu, de nouvelles théories basées sur des études immunohistochimiques et moléculaires se développent en insistant sur la trompe de Fallope qui aurait un rôle prépondérant dans la genèse du cancer de l'ovaire.

Nous proposons de décrire les états pré-cancéreux dysplasiques de l'ovaire et de la trompe au niveau morphologique, immunohistochimique et moléculaire : une meilleure connaissance de la dysplasie, la mise en évidence de marqueurs et de signatures moléculaires spécifiques permettraient probablement de mieux appréhender la carcinogenèse ovarienne.

## **A : Les différentes théories de cancérogenèse ovarienne**

### **1/ La théorie génétique :**

La prédisposition héréditaire à développer un cancer de l'ovaire ne concerne que 10% des cancers de l'ovaire. Alors que le risque dans la population générale de cancer de l'ovaire est de 1.4 à 1.7%, le risque en cas de prédisposition génétique passe à 5% (un antécédent au 1<sup>er</sup> degré) et à 8% (deux antécédents au 1<sup>er</sup> degré). De plus, ce groupe de patientes développera leur cancer dix années plus tôt que dans la population générale où l'âge moyen de survenue est de 59 ans [4].

Il s'agira volontiers de femmes jeunes âgées de moins de 50 ans, pouvant développer plusieurs cancers (ovaire+ sein, ovaire+colon), et ayant des apparentés au 1<sup>er</sup> degré atteints d'un cancer de l'ovaire, du sein, du colon, ou de l'endomètre. Le diagnostic de forme familiale de cancer de l'ovaire peut être évoqué si, dans une même branche familiale, on

observe trois cas de cancer de l'ovaire ou de cancer de l'ovaire et du sein. Plusieurs syndromes sont décrits [5-7] (cf tableau 1).

Le type histopathologique est volontiers épithélial, avec une prédominance de cancers séreux de haut grade.

Les mutations génétiques les plus fréquentes concernent les gènes BRCA1 ou BRCA2, qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes. Le risque global de cancer de l'ovaire oscille entre 28 à 60% en cas de mutation BRCA1, et entre 11 à 27% en cas de mutation BRCA2 [8].

Le gène BRCA1 (BRCA1 Breast Cancer-1) est situé sur le bras long du chromosome 17 en 17q21. Il s'agit d'un gène de 24 exons répartis sur 80Kb, codant pour une protéine de 1863 acides aminés, ayant les caractéristiques d'une protéine à doigts de zinc. Plus de 70 mutations sont décrites, touchant n'importe quelle région, -y compris les séquences régulatrices du gène- et concerneraient 0.1 à 0.2% de la population générale [9].

BRCA 1 prédisposerait seulement aux cancers épithéliaux invasifs de l'ovaire et n'interviendrait pas dans la genèse des tumeurs border-lines et des cancers non épithéliaux.

Le gène BRCA 2 (BRCA2 Breast Cancer-2) est localisé sur le bras long du chromosome 13 en 13q12-13. Il s'agit d'un gène de 26 exons répartis sur 70Kb, codant pour une protéine de 3418 acides aminés. Il est impliqué dans 74% des prédispositions aux cancers du sein des femmes jeunes non liées à BRCA 1 (risque cumulé à 80 ans de 87%), dans la majorité des prédispositions communes aux cancers du sein chez l'homme et la femme, et pourrait être responsable de l'ensemble des syndromes héréditaires sein/ovaire non liés à BRCA 1 [9].

Si les gènes BRCA 1 et 2 rendent compte de la majorité des syndromes familiaux sein/ovaire, on retrouve néanmoins un certain nombre de cas familiaux sans mutation BRCA 1 ou 2 associés.

D'autre part, ont été décrites des mutations au niveau du gène E-cadhérine (qui est un anti-oncogène), localisé en 16q22, dans certaines tumeurs ovariennes [10-12].

Les gènes BRCA1 et 2 ont des rôles clé dans la signalisation et la réparation de l'ADN [10].

Le TP 53 est quant à lui un gène suppresseur de tumeur qui intervient directement dans l'apoptose. Les mutations BRCA sont source d'instabilité chromosomique, -probablement l'un des premiers éléments de la cancérogenèse ovarienne-, auxquelles s'associe l'inactivation de p53 (cf infra), répondant ainsi à la théorie classique du « two-hits phenomenon » : il faut toujours au moins deux événements pour déclencher le processus de cancérisation. Vont pouvoir s'ajouter diverses mutations somatiques et épigénétiques, hyperméthylation du



promoteur BRCA ou encore perte d'hétérozygotie. Ces cellules instables génétiquement échappent à l'apoptose et pourront alors se multiplier [13-15].

Des instabilités microsatellitaires sont également retrouvées dans les syndromes de Lynch I et II [16] avec perte ou mutations des gènes du système de réparation des mésappariements (MisMatch Repair ou MMR : MSH2, MLH1) aboutissant finalement à d'autres événements délétères comme des pertes d'hétérozygotie ou mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs (en particulier PTEN). L'absence de réparation des erreurs de réplication de l'ADN entraîne ainsi une cascade d'évènements oncogéniques via la voie de signalisation AKT.

A côté de ces cancers de l'ovaire « héréditaires » directement liés aux mutations BRCA1 ou 2, certains auteurs se sont interrogés sur la relation éventuelle entre les cancers de l'ovaire sporadiques (soit 90% des cancers de l'ovaire) et les gènes BRCA 1 et 2 [17].

Effectivement, même si ces deux gènes sont rarement mutés dans les cancers sporadiques, leur fonction est bien souvent altérée (perte d'hétérozygotie LOH, inactivation ou encore hyperméthylation du promoteur concernant jusqu'à 82% des cas en fonction des études) source de perturbations d'expression d'autres gènes [18-23].

BRCA constituerait-il la clé du cancer de l'ovaire à la fois sporadique et héréditaire ?

Pour l'instant, il est sûr que les gènes BRCA peuvent être impliqués dans la cancérogenèse ovarienne, mais sont-ils la cause initiale du cancer ou bien la conséquence d'autres événements antérieurs ? On constate par exemple que les cancers héréditaires par mutation BRCA1 ou 2 ont un potentiel plus invasif, sont volontiers de haut grade et de type histopathologique séreux, par rapport aux cancers sporadiques. D'autre part, d'autres oncogènes et antioncogènes interviennent, comme le p53 : des souris hétérozygotes pour la mutation BRCA1 ou 2 présentent une atrophie ovarienne sans cancer en réponse aux stimulations oestrogéniques. Par contre, l'inactivation p53 supplémentaire est source de cancers : la mutation des gènes BRCA n'est donc pas suffisante et requiert l'addition d'autres mutations géniques [24].

Dans tous les cas, même si BRCA ne peut probablement pas expliquer tous les cancers de l'ovaire, il fournit un excellent modèle d'étude de la cancérogenèse ovarienne [25].

	Syndrome des cancers ovariens spécifiques du site	Syndrome des cancers sein/ovaire	Syndrome de Lynch type II
Age moyen (années)	49	52	45
Forme familiale	≥ 3 cas de cancers de l’ovaire	≥ 3 cas de cancers du sein et ≥ 2 cas de cancers de l’ovaire	≥ 3 cas de cancers du colon (sans polypose associée, dont un cas avant l’âge de 50 ans) et/ou cancers de l’endomètre, des voies biliaires, de l’appareil urinaire, du grêle, des ovaires
Risque relatif	3.6	2	9 à 10%
Mutations génétiques	Mutations BRCA 1 dans 75% des cas	Mutations BRCA1 ou BRCA2 dans 95% des cas	Mutations des gènes MMR : hMSH2, hMLH1

Tableau 1 : risque génétique et syndromes familiaux de cancers de l’ovaire [4-7]

MMR (MisMatch Repair) : gènes du système de réparation des mésappariements

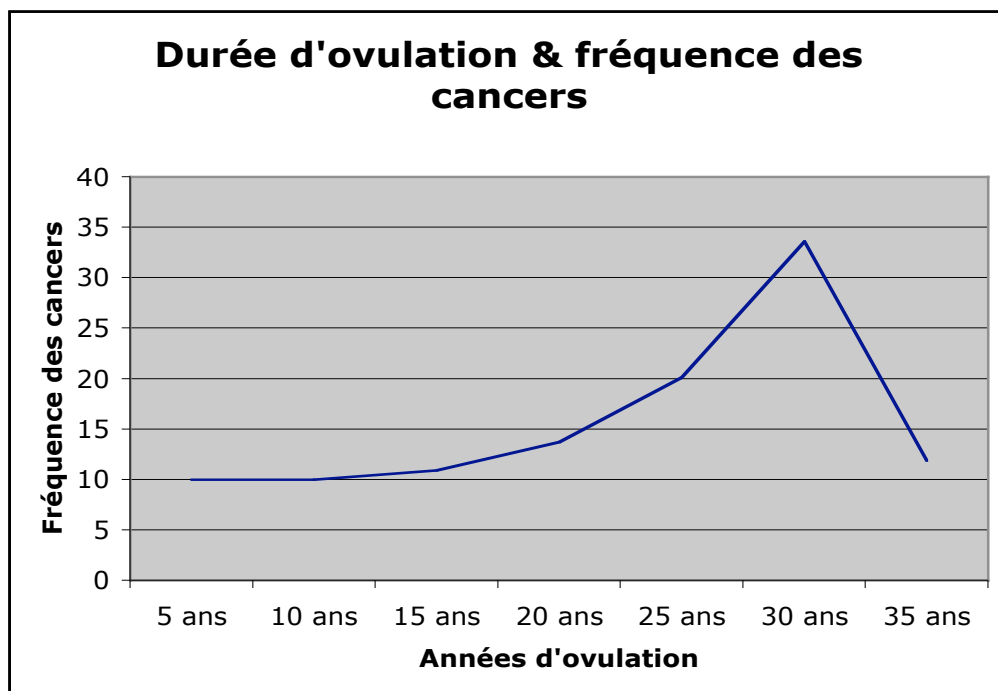
## **2/ La théorie de l’ovulation incessante :**

En 1971, Fathalla [26], constatant la fréquence plus importante du cancer de l’ovaire chez les nullipares a émis l’hypothèse que l’ovulation pouvait être à l’origine de la transformation maligne de l’épithélium ovarien. En effet, chaque ovulation crée un traumatisme mineur sous forme d’une rupture au niveau de la surface épithéliale. Au cours du processus de cicatrisation, des kystes d’inclusion d’épithélium ovarien peuvent se former dans le stroma et ainsi, soumis à des facteurs de croissance cellulaires ou hormonaux, être à l’origine d’une prolifération puis de la transformation néoplasique.

Il paraît surprenant d’évoquer ainsi qu’un processus aussi naturel et physiologique que l’ovulation puisse être rendu responsable de cette pathologie. Cependant, cette théorie est corroborée par plusieurs faits épidémiologiques et expérimentaux.

- arguments épidémiologiques :

Certaines observations épidémiologiques humaines sont en faveur de la validité de cette théorie, avec notamment le rôle protecteur de la contraception orale, de la grossesse, et de l'allaitement maternel par inhibition de l'ovulation [27]. De même, plusieurs études épidémiologiques ont montré que le risque relatif de cancer de l'ovaire augmente significativement entre 2 à 4.5 fois en cas de durée d'ovulation supérieure à 35 ans par rapport aux patientes ayant une vie ovulatoire inférieure à 25 ans. Purdie *et al* [28] a ainsi étudié les effets de l'ovulation en comparant 791 cas de tumeurs ovariennes versus 853 témoins : après ajustement, il retrouve une augmentation significative du risque de 20% (OR=1.2, 95%IC = 1.13-1.27) dans le sous-groupe 20-29 années ovulatoires (cf graphique 1); il constate même une augmentation du risque de 6% pour chaque année ovulatoire supplémentaire dans le sous-groupe 30-39 années d'ovulation.



Graphique 1 : Fréquence du cancer de l'ovaire en fonction de la durée d'ovulation, d'après Purdie *et al* [28]

- arguments expérimentaux :

La responsabilité directe de l'ovulation dans la carcinogenèse ovarienne est apportée par les études animales : forte prévalence des carcinomes péritonéaux d'origine ovarienne chez les volailles élevées en batterie et forcées d'ovuler (ovulations toutes les 28 heures, taux de cancers ovariens spontanés de 30 à 40% à l'âge de 4 ans) [29], et l'étroit rapport (quasi-exponentiel) entre le nombre d'ovulations et la transformation maligne de l'épithélium de surface de l'ovaire des souris [30].

De là, à incriminer les techniques de procréation médicalement assistée et en particulier de stimulation ovarienne dans la genèse des cancers de l'ovaire suite à des mécanismes d'hyperovulation, l'idée paraissait logique et ne demandait qu'à être étudiée.

En 1982, Bamford et Steele [31] publiaient le premier cas de cancer épithélial de l'ovaire relié à une stimulation de l'ovulation par gonadotrophines. Depuis, beaucoup d'auteurs ont considéré les inducteurs de l'ovulation comme des facteurs de risque potentiel de cancers de l'ovaire: ainsi, Whittemore *et al* [32] retrouvait une association significative en cas d'utilisation d'inducteurs de l'ovulation (OR= 2.8 ; IC 95%= 1.3-3.6), notamment en cas de stérilité d'origine ovulatoire et surtout s'il n'y avait pas eu de conception (RR à 27.0, IC 95%= 2.3-315.6). Rossing *et al* [33] confirmait les résultats de Whittemore, avec un risque relatif de 2.5 (IC 95%= 1.3-4.5), variable selon la dose et le médicament utilisés : l'HCG n'augmenterait pas le risque, à la différence du Clomid où le risque atteignait 11.1 (IC 95%= 1.5-82.3) en cas d'utilisation prolongée dépassant plus de 12 cycles.

Pour autant, ces études comportent de nombreux biais qui doivent rendre l'interprétation des résultats très prudente. C'est pourquoi nous avons récemment analysé des ovaires apparemment sains soumis à des protocoles de stimulation de l'ovulation : des anomalies significatives cytologiques et architecturales qualifiées de dysplasie ont bel et bien été mises en évidence au niveau de certains de ces ovaires stimulés par rapport à une population témoin et à une population de patientes nullipares [34, 35]: ces anomalies histopathologiques seraient d'autant plus sévères et nombreuses qu'il y a de cycles de stimulation (>3, effet-dose) et après un délai suffisamment long (plus de sept années, effet-temps) sans préjuger de l'évolution à long terme [35]. Effectivement, le profil de dysplasie des ovaires stimulés est différent du profil évolutif des ovaires à risque génétique (mutations BRCA) tant et si bien que l'on ne peut pas à l'heure actuelle affirmer la relation causale stimulation de l'ovulation / cancer [36, 37].

A la lumière de ces arguments, la théorie de l'ovulation incessante met en exergue l'épithélium de surface de l'ovaire comme origine du cancer de l'ovaire, ce qui est corroboré par des études récentes animales, moléculaires et de cultures cellulaires.

La mise en évidence empirique d'un continuum entre épithélium normal, dysplasie et cancer de l'ovaire débutant stade I fait penser que ces tumeurs dérivent des cellules épithéliales qui recouvrent la surface de l'ovaire.

La participation de l'épithélium de surface dans le mécanisme ovulatoire est basée initialement sur l'expérimentation animale :

L'ovulation est inhibée par l'ablation chirurgicale de l'épithélium de surface ovarien chez les grenouilles *in vitro* [38], et chez les moutons *in vivo* [39]. La simple manipulation de la surface ovarienne (source de microtraumatisme de l'épithélium en raison de sa grande fragilité) empêche l'ovulation chez les cochons [40]. Osterholzer *et al* [41] a démontré que l'épithélium de surface chez le lapin présentait une activité proliférante localisée au niveau du traumatisme ovulatoire et agissant au moment même de l'ovulation.

De ces observations animales, et grâce aux progrès de la biologie moléculaire, a été mis au point un modèle d'ovulation faisant intervenir l'épithélium de surface [42] :

Schématiquement, les gonadotrophines se fixent sur leurs récepteurs situés au niveau de l'épithélium de surface, entraînant la sécrétion d'Activateurs du Plasminogène (PA) : le plasminogène interstitiel est alors converti en plasmine sous l'action des PA, ce qui active des collagénases et libère le TNF  $\alpha$  des cellules endothéliales. Le TNF  $\alpha$  induit la production de métallo-protéinases matricielles MMP-1 et MMP-2.

Les collagénases interrompent le réseau de collagène au niveau de la thèque interne, via les MMP-1 et MMP-2, pour finalement aboutir à la rupture folliculaire et à l'ovulation.

Les études animales confirment le rôle fondamental du PA synthétisé par l'épithélium de surface ovarien : la concentration en PA est largement augmentée chez les porcs en phase pré-ovulatoire [43] et, chez les rats [44]. Inversement, l'administration d'inhibiteurs du système PA-Plasmine empêche l'ovulation chez les rates [45].

On décrit deux types d'activateurs du plasminogène : la forme urokinase (uPA) et la forme tissulaire (tPA).

La plupart des études fonctionnelles mettent en évidence une activité prépondérante dans la coagulation et en particulier la thrombolyse pour tPA, alors que uPA interviendrait plutôt au niveau des phénomènes de dégradation cellulaire et tissulaire, et pour ce qui nous concerne,

l'ovulation : l'ablation de l'épithélium de surface entraîne l'effondrement de la concentration en uPA, et, l'ovulation est tout simplement supprimée par l'injection d'anticorps anti-uPA, ce qui n'est pas le cas avec les anticorps anti-tPA [39].

Ce système enzymatique joue également un rôle prépondérant dans la carcinogenèse ovarienne : l'urokinase (uPA) est synthétisée par les cellules malignes épithéliales de l'ovaire ; la production de plasmine, via uPA, active des collagénases qui interviendront dans la cascade d'événements à l'origine du processus d'invasion tumorale [34] ; uPA facilite également la croissance et l'angiogenèse tumorale [46].

De là à penser que ce système enzymatique serait une clé dans la thérapeutique anticancéreuse, il n'y a qu'un pas, démontré par les études animales : l'immunoneutralisation de uPA bloque l'invasion tumorale *in vitro* [47-48], et l'extension tumorale chez la souris nude [49].

Par ailleurs, l'épithélium de surface aux rôles fonctionnels complexes possède aussi des propriétés de « **plasticité** » [50-52]: ce tissu présente en fait un phénotype mixte, épithélial et mésenchymateux, c'est-à-dire qu'il peut adopter une morphologie épithéliale ou mésenchymateuse en réponse à certains stimuli comme l'ovulation par exemple. Les caractères épithéliaux sont représentés par exemple par la présence de kératine (type 7, 8, 18, 19), de mucine, de desmosomes, de microvilli apicaux, de laminine, de collagène de type IV alors que le phénotype mésenchymateux ou stromal s'exprime par la présence de N-cadherine, de collagène de type I et III, et de vimentine. La mise en culture tissulaire de cet épithélium démontre sa plasticité avec la possibilité de passer d'un état épithélial à un phénotype mésenchymateux : la transition épithélio-mésenchymateuse. La conversion vers l'état mésenchymateux diminue lors de la progression néoplasique pour finalement ne conserver que le phénotype épithélial, modifié avec la formation de structure glandulaire et papillaire. Cet épithélium néoplasique acquiert également le marqueur de différenciation épithéliale E-cadherine et l'expression du récepteur de facteur de croissance C-met est augmentée, ce qui contribue à la croissance tumorale [53].

L'épithélium de surface produit donc un certain nombre d'enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice extra-cellulaire, ce qui va conférer de cette façon un phénotype « invasif » physiologique, alors même qu'il n'y a pas encore de cancer. Feeley *et al* [54] émet ainsi l'hypothèse que la conjonction de ce phénotype « inné » agressif à la présence anormale

de kystes d'inclusion (par dysfonction ou dysrégulation) suffirait à conduire à la tumorigenèse.

Le tableau 2 présente les principales caractéristiques de l'épithélium normal et malin.

	Epithélium de surface Normal	Epithélium de surface Malin
Morphologie	Simple épithélium cubique ou cylindrique	Variable complexe, avec des caractéristiques de différenciation tubaire, endométriale, ou endocervicale
Sécrétion de protéases	Pendant l'ovulation	Pendant l'invasion tumorale
Intégrines	$\alpha\text{-}\beta 1$ , $\alpha 6\beta 4$ , $\alpha v\beta 3$	$\alpha\text{-}\beta 1$ , faibles niveaux de $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 4$ , niveaux variables de $\alpha v\beta 3$
Cadhérines	N-cadhérines	N, E, et/ou P-cadhérine
Sécrétion hormonale	GnRH, inhibine	GnRH, activine
Sécrétions de facteurs de croissance	TGF $\beta$ , TNF $\alpha$	LPA, EFG, IGF, VEGF, bFGF, TNF $\alpha$
Sécrétions de cytokines	IL-1, IL-6, M-CSF, G-CSF, GM-CSF	IL-1, IL-6, M-CSF, G-CSF, GM-CSF
Récepteurs hormonaux	GnRH, activine, FSH, LH	GnRH, activine, FSH, LH
Récepteurs aux stéroïdes	Oestrogènes, progestérone, corticostéroïdes, androgènes	Oestrogènes, progestérone, androgènes
Récepteurs aux facteurs de croissance	EGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , HGF, PDGF	EGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , HGF, VEGF, PDGF, bFGF

Tableau 2 : Propriétés morphologiques et critères de différenciation entre l'épithélium de surface ovarien normal et malin [50, 51].

### **3/ L'hypothèse hormonale :**

#### **- La théorie des gonadotrophines [55] :**

Ce mécanisme hormonal s'expliquerait par une hyperstimulation de l'épithélium ovarien de surface par les oestrogènes et/ou leurs précurseurs, sous l'effet d'une concentration élevée et persistante de LH et FSH et après interruption du rétro-contrôle négatif. L'exposition persistante aux gonadotrophines s'accompagnerait secondairement d'une élévation de la concentration en œstrogènes. Cette théorie s'appuie sur la mise en évidence expérimentale de récepteurs aux gonadotrophines au niveau des cellules tumorales [55]. Au niveau moléculaire, des récepteurs à FSH et LH sont présents dans près de 60% des cancers ovariens. D'autre part



les gonadotrophines peuvent activer différentes voies de signalisation comme la voie des MAKP, EGFR (epidermal growth factor receptor), HER2, C-MYC,  $\beta$ -cathénine, Cycline G2 et IGF-1 (insuline growth factor 1) [ 56, 57]. L'expérimentation animale a pu montrer une relation entre exposition aux gonadotrophines ,croissance tumorale et angiogenèse (expression majorée de VEGF vascular endothelial growth factor) mais n'a pas réussi à démontrer l'initiation tumorale [ 58]. Cette hypothèse est également mise en défaut par deux autres constatations :

- Le traitement hormonal substitutif (THS) diminue les taux circulants des gonadotrophines et ne réduit pas l'incidence du cancer de l'ovaire (pic de fréquence à 59 ans) [ 59]. Le THS n'apparaît d'ailleurs pas comme un facteur protecteur, certaines études retrouvant au contraire un risque majoré sous THS [60].
- La dose d'œstrogènes dans la contraception orale, qu'elle soit mini-dosée ou fortement dosée, affecte différemment le taux circulant de gonadotrophines, mais confère le même degré de protection contre le cancer.

- *La théorie des androgènes* [61] :

Les androgènes sont synthétisés par les cellules de la thèque de l'ovaire et sont présents dans le liquide folliculaire. En post-ménopause, l'ovaire conserve sa faculté à produire des androgènes et présente d'ailleurs des récepteurs spécifiques aux androgènes dans des conditions physiologiques . Plusieurs arguments épidémiologiques relient androgène et cancer de l'ovaire :

- La contraception orale est un facteur protecteur du cancer de l'ovaire, peut-être en raison de son rôle dans l'inhibition de la synthèse des androgènes (diminution de la synthèse de testostérone entre 35 à 70%).
- Concentration élevée d'androstènedione chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire.
- Risque élevé chez les patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques (OR= 2.4, 95% CI= 1.0-5.9), syndrome associé à des taux accrus d'androgènes.
- Risque élevé chez les patientes obèses, l'obésité étant liée à des niveaux élevés d'androgènes.

- ***La théorie oestro-progestative [61] :***

A l'inverse des oestrogènes, la progestérone [62] a un rôle protecteur du cancer de l'ovaire : toute situation s'accompagnant d'une insuffisance lutéale avec hyperoestrogénie relative serait donc à risque.

Cette théorie s'appuie sur les arguments épidémiologiques suivants :

- la grossesse est un facteur protecteur peut-être grâce à la présence de progestérone synthétisée par le placenta (taux multiplié par 10).
- La contraception orale est également un facteur protecteur, et s'accompagne d'une augmentation du taux de progestérone.
- Les cellules tumorales ovariennes présentent des récepteurs spécifiques aux oestrogènes (ER): les oestrogènes stimulent la prolifération tumorale des cellules contenant ces ER. Inversement, la progestérone exercerait un rôle protecteur : d'une part, différentes études épidémiologiques ont retrouvé un risque réduit de cancers de l'ovaire chez les patientes utilisant une contraception par progestatifs purs [63, 64] ; D'autre part, la concentration en récepteurs à la progestérone (PR) est nettement diminuée au niveau des cellules tumorales contrairement aux cellules normales, et, l'expression des PR serait en relation directe avec une amélioration de la survie, probablement par divers mécanismes d'inhibition de la prolifération tumorale et d'induction d'apoptose, sous l'action de la progestérone [62].

**4/ La théorie de l'inflammation pelvienne chronique :**

Se basant sur le rôle protecteur de la ligature tubaire et de l'hystérectomie (empêchant l'exposition aux germes irritants du tractus génital) [65, 66], et sur les facteurs de risque représentés par différents agents responsables d'inflammation comme l'endométriose, l'exposition au talc et l'asbestose, l'hypothèse de l'inflammation pelvienne chronique a été proposée [67, 68].

La présence de *Chlamydia trachomatis* et *mycoplasma hominis* (sérologies positives retrouvées dans respectivement 48% et 37% des cas) dans les stérilités non tubaires est un argument pour cette théorie de l'inflammation en raison de l'effet potentiel sur l'ovaire lui-même[69]. Plus intéressant encore serait le rôle potentiel de Human PapillomaVirus HPV. Si l'implication de HPV sur le cancer du col de l'utérus est démontrée, certaines études ont isolé

HPV au niveau de l'épithélium de surface de l'ovaire [69], et HPV16 et 18 ont même été identifiés lors de carcinomes de l'ovaire [70]. Les analyses cytogénétiques ont réussi à prouver le rôle carcinogène de HPV dans certains cancers de l'ovaire : il induirait des mutations génétiques (en particulier au niveau des bras courts du chromosome 16, 19, 21, 22, et des amplifications de la région 20q13.2), source d'instabilité génique et chromosomique [71].

On peut d'ailleurs retrouver l'implication de différents médiateurs de l'inflammation dans la carcinogenèse ovarienne (cyclo-oxygénase 2, NO synthase, VEGF) [ 72].

L'inflammation pelvienne chronique est-elle une des étiologies du cancer à part entière ? Un co-facteur ayant une véritable implication dans la cancérogenèse ovarienne ? Un facteur confondant, un biais intervenant dans l'infertilité mais pas dans la cancérogenèse ?

### **5/ La théorie de l'hyperactivité stromale :**

Il est néanmoins difficile de comprendre comment la grossesse et la contraception orale, intéressant la femme jeune, peuvent protéger d'une maladie qui apparaîtra 30 à 40 ans plus tard. Même si l'on peut imaginer un effet résiduel de la contraception sur le taux de gonadotrophines, Cramer et Welch [55] ont proposé que la contraception réduirait l'activité stromale. En effet pendant une ovulation normale, l'hyperactivité stromale agit sur la réparation du traumatisme ovulatoire grâce à une prolifération épithéliale. La plupart des cellules stromales entrent ensuite en apoptose. Or, certaines de ces cellules pourraient persister, d'autant plus qu'il y a d'ovulations et favoriser une prolifération épithéliale anarchique.

### **6/ La théorie des résidus Müllériens :**

A côté de la théorie prétendant que l'épithélium de surface de l'ovaire est à l'origine de la cancérogenèse ovarienne, une autre hypothèse considère le « deuxième système müllérien » : il est situé anatomiquement près du hile de l'ovaire et contient histologiquement les structures tubulaires adjacentes au rete testis, et celles localisées dans les régions paratubaires et paraovariennes. Ces structures sont recouvertes d'un épithélium müllérien et représentent probablement un résidu embryologique des canaux müllériens proximaux (invagination de l'épithélium coelomique), précurseurs de l'épithélium tubaire, de l'endomètre, et de l'endocol [73]. La relation étroite unissant le développement de

l'épithélium de surface de l'ovaire et l'épithélium Mullérien peut sans aucun doute expliquer l'acquisition de caractéristiques fonctionnelles et architecturales müllériennes lors de la cancérogenèse ovarienne et donc, les similitudes existant entre les différents types de cancers de l'ovaire et les tumeurs épithéliales müllériennes: tumeurs séreuses papillaires (similitudes avec l'épithélium tubaire), tumeurs mucineuses (similitudes avec l'épithélium endocervical), tumeurs endométrioides (similitudes avec l'épithélium endométrial) [73].

L'épithélium de revêtement ovarien et le mésothélium ayant une origine embryologique commune, certaines carcinoses péritonéales pourraient ainsi survenir sur ovaires indemnes et/ou après ovariectomie prophylactique.

Cependant, les carcinomes de l'ovaire débutants sont statistiquement situés dans le parenchyme cortical proche de la surface –au niveau des kystes d'inclusion- plutôt qu'en profondeur vers le hile de l'ovaire. Ce deuxième système müllerien serait plutôt une transition entre les deux épithéliums (de surface et müllerien) et il est probable que même s'il donne naissance à des cancers, ils seraient moins fréquents à ce niveau [54].

## **7/ Proposition de synthèse : vers un modèle intégré ? (cf figure 2)**

Fleming *et al* [73] propose un modèle de cancérogenèse ovarienne en intégrant les différentes théories (théorie de l'ovulation incessante, théorie de l'inflammation pelvienne chronique, théorie hormonale, théorie de l'hyperactivité stromale).

La surface épithéliale est normalement séparée du stroma sous-jacent par la tunique albuginée, si bien que l'invagination des cellules épithéliales de surface dans ce stroma pour former des kystes d'inclusion génère un microenvironnement dans lequel les cellules épithéliales subissent l'influence paracrine (hormonal par le biais des oestrogènes, et par l'action de facteurs de croissance et de cytokines), de mitogènes (stimulant la prolifération cellulaire), de morphogènes et/ou de mutagènes du cortex ovarien (stimulant des mutations au niveau des cellules épithéliales de surface). On constate d'ailleurs que l'épithélium de surface présente une activité proliférante accrue à proximité d'un stroma lui-même hyperactif.

Cette interaction serait ainsi à l'origine :

- de la différenciation épithéliale
- de la métaplasie müllérienne [74, 75]
- de la transformation cancéreuse : en effet, l'épithélium de surface secrète des cytokines comme l'Interleukine 1 (IL1) et l'Interleukine 6 (IL 6). Or, ces deux

interleukines favorisent la prolifération tumorale et IL 1 induit la formation du  $\text{TNF } \alpha$ , qui est un mitogène des cellules épithéliales ovariennes [76].

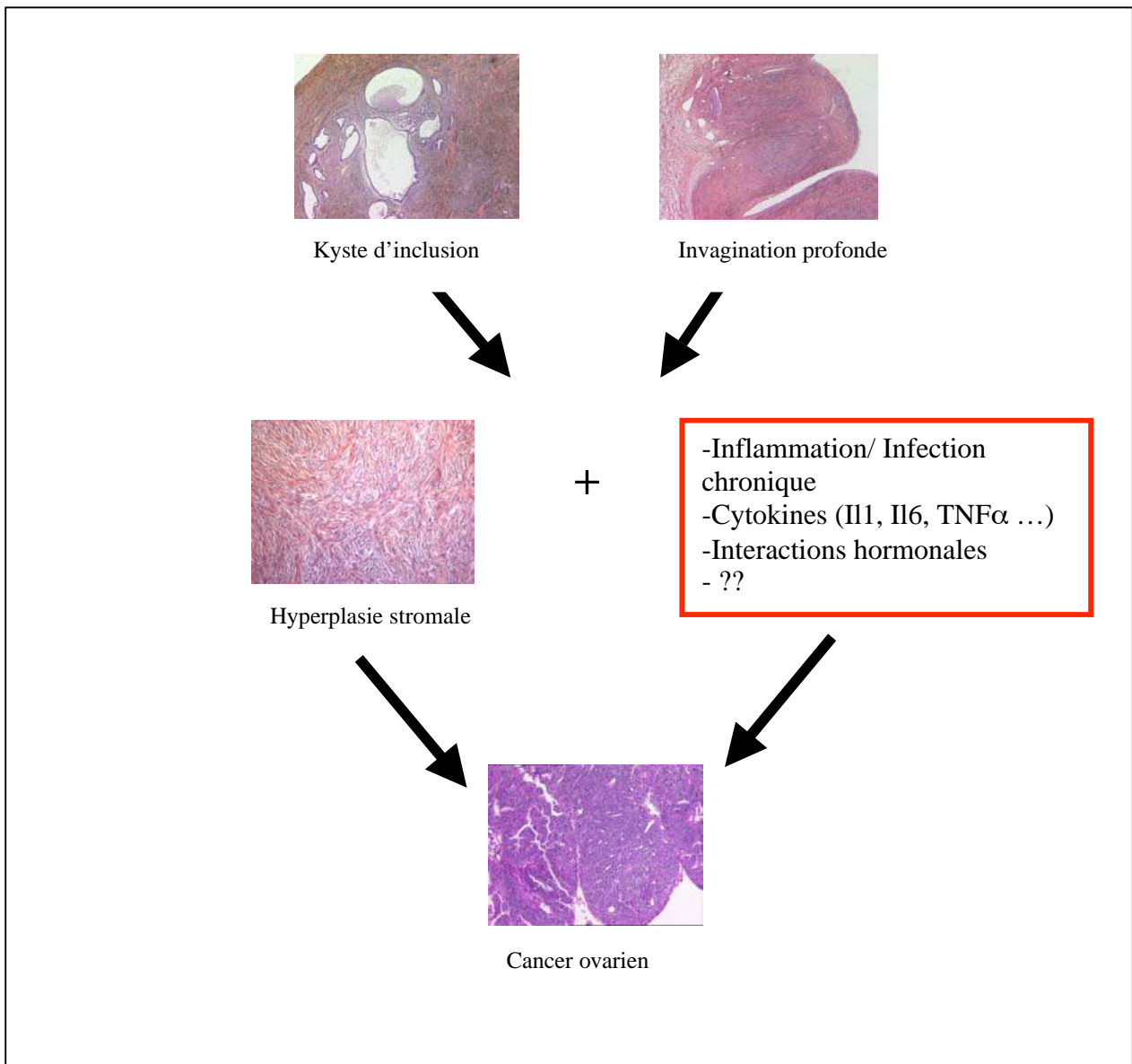


Figure 2 : Modèle de cancérogenèse ovarienne modifié d'après Fleming [73] et d'Auersperg [50]: *Au cours du processus de cicatrisation de l'ovulation peuvent se former des invaginations épithéliales profondes qui donneront naissance à des kystes d'inclusion. Les cellules épithéliales recouvrant les kystes peuvent se différencier et revêtir des caractéristiques müllériennes (métaplasie müllérienne). Sous l'influence hormonale du stroma et sous l'effet de cellules pro-inflammatoires (macrophages, monocytes), de cytokines et peut-être de cellules souches pluripotentes (?), surviendrait la transformation maligne.*

## **8/ L'origine tubaire ?**

La théorie tubaire [77, 78] part du constat suivant : l'analyse histopathologique méticuleuse et exhaustive des pièces d'annexectomies prophylactiques révèlent jusqu'à 10% de cancers occultes, dont 57% à 100% sont localisés au niveau de la portion distale des trompes (cancer séreux intraépithéliale tubaire STIC) [79-83]. (cf tableau 3).

Plusieurs séries de cancers ovariens sporadiques (sans mutation BRCA) ont été à nouveau analysées et ont objectivé la présence d'anomalies tubaires dans près de 50% des cas, faisant suspecter l'origine tubaire dans la cancérogenèse ovarienne.

L'apport immunohistochimique a révélé un marquage significatif, précoce et prédominant (expression entre 80% à 92%) par le TP53, dénommé « signature p53 » [77, 78, 84] : une succession d'au moins 12 cellules positives pour p53 auxquelles s'associent une forte positivité du marqueur de prolifération Ki67 et du marqueur de cassure double brin de l'ADN  $\gamma$ H2AX (cf infra).

Le modèle de carcinogenèse ovarienne proposé consisterait ainsi en l'apparition d'anomalies tubaires dysplasiques, de mutations du p53, de stress génotoxique associé (essentiellement au niveau des cellules tubaires de type sécrétoire), d'expansion clonale, puis évolution vers le STIC et enfin extension métastatique par contiguïté vers l'ovaire et le péritoine. Si les études des pièces d'annexectomie prophylactique retrouvent effectivement la présence de dysplasie tubaire et la signature moléculaire p53 (précocité avérée des anomalies tubaires dans les états pré-cancéreux), la chronologie des différents événements est beaucoup plus complexe à démontrer dans les stades tardifs et il n'est pas certain que les anomalies tubaires associées aux cancers de l'ovaire soient les premières à apparaître. Quoi qu'il en soit, ces données soulignent l'importance de la salpingectomie associée en cas d'ovariectomie prophylactique et l'analyse anatomopathologique complète des ovaires et des trompes.

	Nombre de cas	Nombre de cancers occultes	Origine tubaire
Powell <i>et al</i> [78]	67	7 (10%)	4 (57%)
Finch <i>et al</i> [79]	159	7 (4%)	6 (86%)
Callahan <i>et al</i> [80]	100	7 (7%)	7 (100%)
Leeper <i>et al</i> [81]	30	5 (17%)	3 (60%)
Medeiros <i>et al</i> [82]	13	5 (38%)	5 (100%)

Tableau 3 : Origine tubaire des cancers occultes découverts sur les pièces d'annexectomie prophylactique pour mutation BRCA

### **9/ Schéma moléculaire d'oncogenèse ovarienne : vers une simplification ? (cf tableau 4)**

Des études récentes histopathologiques et moléculaires ont permis de décrire un modèle de tumorigenèse constitué de deux voies [85-87]:

- Tumeurs de type I : il s'agit de tumeurs de bas grade pour lesquelles la pathogénie consisterait en la séquence cystaédénomes/adénofibromes \_tumeurs borderlines \_cancer. Effectivement, l'identification d'altérations communes aux tumeurs bénignes, à la limite de la malignité et invasives – continuum lésionnel – est démontrée par les analyses moléculaires et génétiques : ces tumeurs comportent des mutations au niveau des gènes BRAF et KRAS dans plus de 60% des cas, moins fréquemment PTEN (20-46%) et  $\beta$  caténine ( $\approx$  30%).
- Tumeurs de type II : Il s'agit de tumeurs d'emblée de haut grade qui pourraient se développer à partir de l'épithélium de surface. Au niveau moléculaire, les mutations du gène p53 sont présentes entre 50 à 80%. Les mutations BRCA 1 et 2 prédisposent aux tumeurs de type II et constituent un excellent modèle d'étude. Les profils d'expression génique retrouvent une surexpression du système HLA-G dans 61% des cas (diminution de la lyse tumorale par inhibition des cellules NK Natural Killers) et des apolipoprotéines E (croissance et survie tumorale facilitée) dans 66% des cas. Contrairement au type I, il n'existerait pas de lésions ovariennes précurseurs comme les cystaédénomes ou borderlines mais des anomalies dysplasiques ovariennes et/ou tubaires : ceci pourrait être en faveur de l'intrication des différentes théories (la vieille théorie

de l'ovulation incessante de Fathalla [26] trouverait ainsi une validation moléculaire) mais aussi l'intérêt de l'étude de ces anomalies histopathologiques dysplasiques (en cours dans notre département).



	Type I	Type II
Fréquence	25%	75%
Mutations	BRAF, K-RAS, PTEN, $\beta$ cathénine	P53, instabilité génique
Profil d'expression génique	Non significatif	Surexpression HLA-G et Apo E
Prolifération cellulaire	Basse	Forte
	Stade I	> Stade I
Evolution	lente	rapide
Survie à 5 ans	55%	30%
Précurseurs	Séquence Cystadénome/adénofibrome puis tumeur borderline	De novo probablement à partir de l'épithélium de surface et de l'épithélium dysplasique
Type histologique	Endométriöide, séreux de bas grade, mucineux Carcinome à cellules claires, Tumeurs de Brenner	Séreux de haut grade, Carcinome indifférencié, carcinosarcome

Tableau 4 : schéma d'oncogenèse à deux voies [84-87]

La plupart des mécanismes moléculaires impliqués dans l'oncogenèse ovarienne ont été déterminés à partir de cancers avancés de l'ovaire. Il est probable que certains de ces mécanismes surviennent précocément afin de permettre le développement tumoral [85] (cf tableau 5):

- croissance tumorale [88-91]:

La tyrosine kinase SRC accélère la prolifération tumorale et l'angiogenèse dans 93% des cancers ovariens et 80% des lignées cellulaires. L'inhibition de SRC a pu ralentir la croissance tumorale chez la souris. D'autres tyrosines kinases (HER1 et HER2) sont également retrouvées dans respectivement 35 à 70% et 20 à 30% des cancers ovariens. Des régulateurs du cycle cellulaire (les cyclines CDK1, CDK2, Cyclines D et E, les facteurs de transcription pRb, E2F) sont exprimés dans les cancers ovariens et jouent sur la croissance cellulaire via différentes voies de signalisation.

- échappement à l'apoptose [95-95]:

L'activation de la voie PI3k/AKT survient dans 30% des cancers de l'ovaire, empêche l'apoptose, favorise la néovascularisation. Les mutations PTEN (impliquées précocement dans les cancers endométrioïdes) interagissent avec la voie AKT.

NFκB est un facteur de transcription qui stimule l'expression de Bcl2 (inhibiteur de l'apoptose que nous avons étudié en immunohistochimie).

- néoangiogenèse [96, 97]:

A côté de VEGF, l'Interleukine IL 8 intervient dans la néovascularisation et la croissance cellulaire dès les stades tumoraux précoces. L'intégrine  $\alpha v \beta 3$  et la tyrosine kinase EphA2 (présents dans 75% des cancers ovariens) stimulent aussi dans des mécanismes angiogéniques. Les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9, impliquées dans l'invasion par digestion du collagène de la membrane basale stimulent aussi la synthèse de VEGF.

Gènes/ Voies de signalisation	Fréquence dans le cancer de l'ovaire (%)
<b>Proliférations cellulaires</b> Activations de : <ul style="list-style-type: none"> <li>• HER 1</li> <li>• HER 2</li> <li>• SRS</li> <li>• IGF/ IGFR</li> <li>• C-MYC</li> <li>• Cyclines B, D, E</li> </ul> Inhibition de : <ul style="list-style-type: none"> <li>• TGF <math>\beta</math></li> <li>• p16, p21, p27</li> </ul>	35-70 20-66 80-90 21-25 30 30-90  40 25-55
<b>Inhibition de l'apoptose</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NF<math>\kappa</math>B</li> <li>• ARHI</li> <li>• PIP3/AKT</li> <li>• PTEN</li> <li>• p53</li> <li>• BRCA1</li> <li>• BRCA2</li> </ul>	??? 40 12-18 20 50-90 6-82 1-3
<b>Facteurs angiogéniques</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• VEGF</li> <li>• IL-8</li> <li>• EphA2</li> <li>• MMPs</li> <li>• <math>\alpha v \beta 3</math></li> </ul>	40-100 ??? 76 40-100 95

Tableau 5: mécanismes moléculaires impliqués dans l'oncogenèse ovarienne , d'après Landen *et al* [85]:

## **B : Intérêt du modèle d'étude des dysplasies/ cancers à risque génétique : rôle pivot de BRCA**

### **1/ Interaction BRCA/ p53**

La mutation du gène suppresseur de tumeur TP53 (localisé en 17p13.1) est une des anomalies moléculaires les plus fréquentes en cancérologie et est retrouvée dans près de 90% des cancers héréditaires sein/ovaire liés à la mutation BRCA. Quelle interaction existe-t-il entre p53 et BRCA ? la mutation p53 est-elle nécessaire et obligatoire pour activer la cancérogenèse ovarienne ? [98]

L'organisation fonctionnelle de la protéine BRCA1 montre différents domaines (NSL intervenant dans la localisation nucléaire, RING permettant l'interaction avec d'autres protéines, TAD ayant des fonctions d'activation transcriptionnelle). Au niveau du domaine RING, on retrouve une protéine BARD1 (BRCA1-associated RING domain ayant des similitudes avec BRCA1) qui a un rôle anti-oncogène important. Une autre protéine interagit à ce niveau, BAP1 (BRCA1-associated protein 1), et aurait un rôle de suppression de la croissance cellulaire. TP53 peut se fixer sur le domaine RING et interagir avec le facteur de transcription favorisant la prolifération cellulaire c-MYC. Il peut aussi se fixer en C-terminal sur le domaine TAD. BRCA1 apparaît ainsi comme un gène suppresseur de tumeur et un régulateur de la transcription [98-100].

BRCA1 en coopération avec BRCA2 (via hRAD51) et TP53 interagissent dans les voies de réparation de l'ADN (essentiellement par recombinaison homologue). Il n'y a pas de réparation de l'ADN chez les souris mutantes pour BRCA1 : il s'en suit une activation de TP53 et un arrêt du cycle cellulaire [101].

Ainsi l'inactivation de p53 dans les cellules pré-cancéreuses avec mutations BRCA éviterait l'apoptose et conduirait au cancer en association avec d'autres mutations somatiques. Pour autant la mutation p53 n'est pas forcément obligatoire. Le marquage p53 est effectivement négatif dans 15% des STICs [76]. On pourrait l'expliquer par :

- les mutations du TP53 peuvent survenir en amont du segment de protéine ciblé par l'analyse immunohistochimique. Les protéines mutées et tronquées ne seront pas détectables.

- la localisation de la mutation BRCA1 est fondamentale :

Si la mutation BRCA1 ne concerne pas l'un des domaines p53, on peut imaginer qu'il faudrait d'autres anomalies moléculaires pour déclencher le processus de cancérisation. Par exemple, 95% des tumeurs porteuses de la mutation BRCA1 en 185delAG (en 5' donc au niveau d'un domaine p53) possèdent une mutation p53 alors que des mutations en amont seraient moins associées à des anomalies du p53 [102].

- dysfonction de p53 (sans mutation) via une synthèse anormale de la p53 binding protein, ou encore l'augmentation de l'ubiquitination.
- d'autres gènes interagissant avec TP53 peuvent être mutés :

Des mutations de p21, ATM, CHK2, MDM2... (gènes appartenant aux voies de réparation de l'ADN) sont suffisantes pour inactiver p53. De même différentes protéines du cycle cellulaire comme la cycline D1 ou encore CDK4 peuvent être altérées et conduire à la carcinogenèse [103, 104].

Compte tenu de ces éléments, la recherche de la « signature moléculaire p53 » décrite dans certaines lésions précurseurs du cancer de l'ovaire semble ainsi être une des étapes précoces. D'autre part, la mise en évidence d'un marqueur spécifique des systèmes de réparation de l'ADN serait un apport essentiel (cf infra sur  $\gamma$ H2AX).

## **2/ Interaction BRCA/Anémie de Fanconi**

L'anémie de Fanconi (FA) est une maladie autosomique récessive associée à une instabilité génomique, marquée par une insuffisance médullaire, une propension à développer des leucémies aiguës myéloïdes et certains types de cancers dont l'ovaire et une hypersensibilité cellulaire aux agents pontant l'ADN (en particulier les sels de platine). Cette maladie constitue un modèle pour mieux comprendre la relation instabilité génomique et cancer.

A ce jour, 10 gènes ont été clonés et au moins 8 (A, C D1, D2, E, F, G et L) interagissent dans une voie de signalisation commune avec les gènes BRCA pour réguler la stabilité chromosomique et la sensibilité au Cis-Platine [105-108].

Dans les cellules normales, en réponse à une altération de l'ADN, six des protéines FA (FANCA, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG et FANCL) vont constituer un complexe nucléaire qui activera la protéine FANCD2 par ubiquitination. Cette dernière interagira avec BRCA1, FANCD1 et BRCA2 afin d'activer les systèmes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue [106-110].

Comme l'inactivation de la voie de signalisation FA/BRCA est à la base de l'apparition des cancers chez les patients souffrant de FA, qu'en est-il de la contribution de cette voie dans la pathogénie du cancer de l'ovaire dans la population générale ?

Taniguchi *et al* [106] ont retrouvé 18% d'inactivation acquise de la voie FA/BRCA par absence d'ubiquitination de FANCD2 liée à une méthylation du gène FANCF. Cette inactivation de la voie FA/BRCA s'accompagnerait d'instabilité génomique et serait probablement une des étapes précoces de la cancérogenèse. Initialement sensible au Cis-Platine, il y aurait plus tardivement une déméthylation du gène FANCF restaurant la voie FA/BRCA, conduisant alors à une plus grande stabilité chromosomique et à une résistance aux sels de platine [111, 112].

Cette interaction FA/BRCA serait certainement intéressante à étudier au niveau des cancers de l'ovaire génétiques par mutation BRCA et ouvre des perspectives en thérapeutique (la voie FA/BRCA est une des cibles des inhibiteurs des PARP) [112]

## **C : Le concept de lésions pré-cancéreuses ovariennes et tubaires: la dysplasie tubo-ovarienne**

La dysplasie épithéliale ovarienne a été initialement décrite au niveau des ovaires à risque génétique de cancer [112, 113]. Bien que l'aspect macroscopique des pièces d'ovariectomies prophylactiques soit bien souvent normal, l'examen anatomopathologique attentif de l'ensemble de l'ovaire est susceptible de mettre en évidence ces modifications cytologiques et architecturales fines dénommées « dysplasie ovarienne » [114]. La première description histopathologique a été rapportée par l'étude de Gusberg et Deligdish en 1984 [3], qui ont examiné les pièces d'annexectomie prophylactique de trois jumelles monozygotes dont l'une était porteuse d'un cancer invasif de l'ovaire (un adénocarcinome endométrioïde, et deux adénocarcinomes papillaires séreux de grade II et III).

Dans les trois cas, les ovaires étaient macroscopiquement normaux. En revanche, l'analyse microscopique révélait diverses anomalies cytologiques et architecturales: papillomatose de surface, kystes d'inclusion, pléiomorphisme nucléaire, pseudostratification épithéliale, et invaginations épithéliales.

Par analogie aux autres lésions précancéreuses du tractus génital, l'association de ces différentes anomalies était alors qualifiée de **dysplasie ovarienne ou de lésions précancéreuses ovariennes** [114].

Par suite, différents auteurs ont rapporté des anomalies similaires au niveau d'ovaires à risque génétique statistiquement significatif par rapport à des populations témoins exempts de risque de cancer gynécologique [115-118]. Le fait que ces ovaires pouvaient évoluer vers le cancer en l'absence d'ovariectomie prophylactique a fait alors considérer la dysplasie épithéliale de l'ovaire comme le chaînon précédant la néoplasie. L'explication physiopathologique se baserait sur la théorie de l'ovulation incessante de Fathalla [26]: au cours du processus de cicatrisation de l'ovulation peuvent se former des invaginations épithéliales profondes qui donneront naissance à des kystes d'inclusion. Les cellules épithéliales recouvrant les kystes peuvent se différencier et revêtir des caractéristiques müllériennes (métaplasie müllérienne). Sous l'influence hormonale stromale et sous l'effet de cellules pro-inflammatoires (macrophages, monocytes), de cytokines et peut-être de cellules souches pluripotentes, surviendrait la transformation maligne [118, 119].

Des lésions dysplasiques équivalentes ont également été mises en évidence au niveau de l'ovaire d'apparence saine et controlatéral à un cancer de l'ovaire unilatéral [74, 120]. En se

basant sur l'argument démontré que le cancer de l'ovaire est bilatéral dans plus de 50% des cas, la dysplasie semblait donc être un élément clé dans la compréhension de la carcinogenèse ovarienne. De même, des stigmates histopathologiques significatifs à type de modifications architecturales, cellulaires et nucléaires étaient mises en évidence sur des zones d'allure saine adjacentes à un cancer de l'ovaire [121, 122].

Plus récemment ont été décrites des lésions similaires ovariennes qualifiées de « *dysplasie* » au niveau des ovaires stimulés au cours de protocoles de fécondation in vitro (FIV). Nieto *et al* [34] a le premier retrouvé des anomalies significatives au niveau d'ovaires stimulés par rapport à une population témoin et à une population de patientes nullipares.

L'étude histopathologique tubaire est apparue plus récemment car les théories de carcinogenèse ovarienne s'appuyaient initialement sur l'ovaire. Pourtant, et de façon surprenante, de véritables lésions cancéreuses intraépithéliales tubaires occultes (carcinomes tubaires intraépithéliales et séreux de haut grade ou « STIC ») ont été rapportées avec une fréquence inhabituelle au niveau de la partie distale des trompes issues de pièces d'annexectomie prophylactique, ce qui a incité l'étude systématique et exhaustive de ces trompes [76-83]. Des lésions tubaires intraépithéliales et séreuses ou « STIL » [13], encore appelées TILT pour certains auteurs (lésions tubaires intraépithéliales en transition), dysplasie tubaire et même atypies épithéliales tubaires pour d'autres [123] ont ainsi été décrites sous forme d'un ensemble d'anomalies tubaires s'étendant entre l'épithélium tubaire normal et le cancer tubaire intraépithélial (STIC pour Serosus Tubal Intraepithelial Carcinoma).

Plus récemment encore, une autre anomalie dénommée SCOUT (Secretory Cell Outgrowths) a été décrite par l'équipe de Crum [124] : il s'agit d'une succession d'au moins 30 cellules épithéliales presque exclusivement sécrétoires, d'aspect plus pseudostratifié donc morphologiquement difficile à distinguer. C'est l'immunohistochimie qui permet d'affirmer le diagnostic avec une faible expression de PAX2, à un moindre degré un faible index de PTEN et Ki67, et le plus souvent l'absence de mutations de p53. Les auteurs précisent que cette entité n'a que peu, voire aucune signification diagnostique [124-128].

L'évolution serait ensuite vers des lésions bénignes exprimant le p53, avec un faible index de prolifération (Ki67<10%) et sans instabilité génétique (γH2AX négatif). Puis il apparaîtrait des lésions prolifératives bénignes exprimant le p53 et correspondant aux lésions dysplasiques que nous étudions. Les auteurs soulignent le fait que toutes ces lésions précurseurs siègent au niveau tubaire et précisent qu'il est très rare d'objectiver des sur-expressions p53 au niveau ovarien [129]. Enfin, les STICs apparaîtraient. Ils sont caractérisés par une stratification



épithéliale, des atypies nucléaires avec augmentation du ratio nucléo-cytoplasmique, la perte de la polarité nucléaire, le pléiomorphisme nucléaire, la perte des cils. Au niveau immunohistochimique, on retrouve une expression intense et diffuse de p53 et un index de prolifération élevé (Ki67 > 40%). L'instabilité génétique serait importante comme le souligne la forte positivité de  $\gamma$ H2AX négatif [129].

Tout ceci souligne l'importance d'une analyse histopathologique exhaustive des trompes, à fortiori lorsqu'il s'agit de salpingectomies prophylactiques. Ces mêmes auteurs ont proposé un protocole d'analyse complète et méticuleuse des trompes en insistant sur le pavillon tubaire (principale localisation des STICs). Il s'agit du protocole SEE-FIM (Sectioning and Extensively Examining the Fimbriated end) [130]:

- fixation de toute la trompe pendant une durée minimale de 4 heures afin de diminuer le risque d'altération de l'épithélium
- multiples sections longitudinales (en 4 parties) puis transversales (tous les 2 à 3 mm) du pavillon tubaire.
- analyse histopathologique exhaustive de toute la trompe et des différentes sections du pavillon.

Cette technique améliorerait le taux de détection des carcinomes occultes de 17% [130].

Toutes ces études centrées sur la trompe en oublieraient presque l'ovaire. Certaines équipes envisageraient même de proposer sous certaines conditions et sous couvert d'un PHRC des salpingectomies prophylactiques avec préservation des ovaires [131]. Przybycin et Kurman [132] vont jusqu'à poser la question provoquante : Are all pelvic (non uterine) serous carcinomas of tubal origine ?

Ils ont tenté de répondre en recherchant la présence de STICs dans une série consécutive de 52 carcinomes pelviens. Sur les 33 carcinomes séreux de haut grade d'origine ovarienne, la présence de STICs était retrouvée dans 20 cas soit 61%. Dans les 13 cas restants (39%), aucun STIC ou carcinome intra-épithélial ovarien n'était mis en évidence [132]. Kindelberger *et al* [77] retrouve des résultats concordants avec l'absence de STICs dans 22 cas de sa série de 42 cancers ovariens, soit 52%. Ces résultats plaident probablement pour une cancérogenèse à point de départ tubaire le plus souvent mais aussi parfois ovarien et justifie l'analyse en parallèle des ovaires et des trompes correspondantes que nous avons menée.

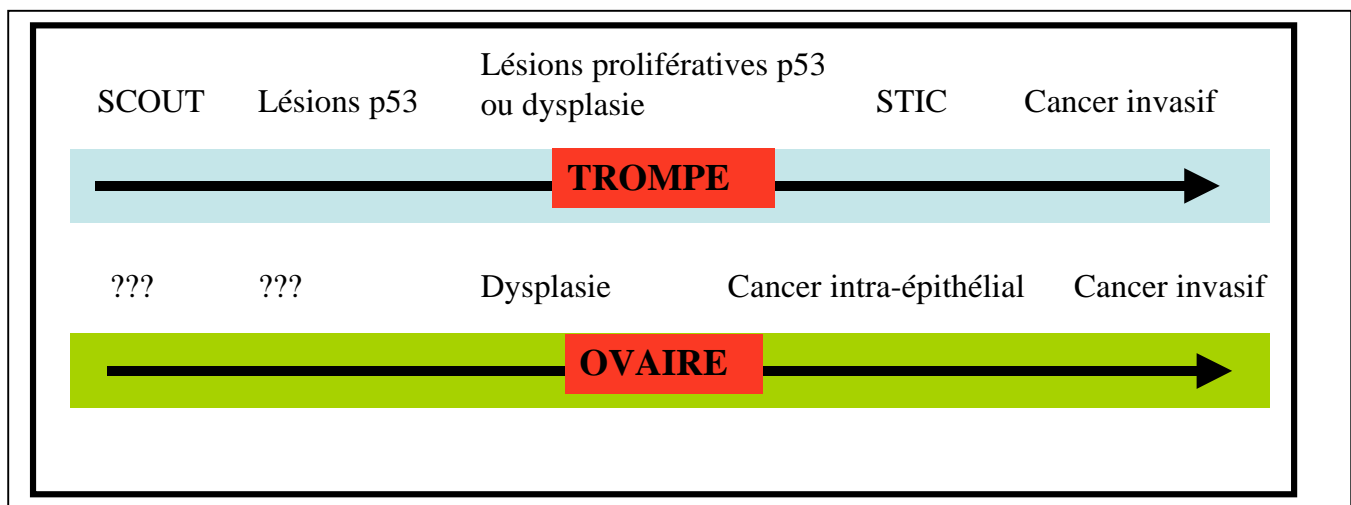


Figure 3: schéma d'oncogénèse tubaire et ovarienne [124-130]

## **Rationnel de l'étude :**

L'histoire naturelle de la cancérogenèse ovarienne est mal connue si bien qu'on ne sait pas s'il existe une phase de latence pré-clinique, et, quelle serait la cinétique de croissance tumorale. A l'instar de l'existence connue et reconnue de lésions précancéreuses vulvaires, vaginales, cervicales ou encore endométriales, et des possibilités et facilités de dépistage, de diagnostic et de traitement précoce, la même question peut se poser en ce qui concerne l'ovaire. Peut-on individualiser un état précancéreux précurseur de la maladie permettant d'intervenir suffisamment tôt pour stopper le processus ?

Enfin, la trompe semble jouer un rôle prépondérant dans la carcinogenèse ovarienne et il serait ainsi intéressant d'étudier l'annexe dans son intégralité.

## **L'objectif de ce travail est triple :**

**1/ proposer une description morphologique de la dysplasie ovarienne et tubaire**

**2/ proposer une étude immunohistochimique à la recherche de marqueurs pertinents de dysplasie**

**3/ proposer une approche moléculaire de la dysplasie. Seule la dysplasie d'origine génétique (issue des annexectomies prophylactiques ) a été étudiée à l'échelon moléculaire.**

## **Matériel & Méthode :**

### **1/ Patientes :**

Nous avons réalisé une étude rétrospective et prospective comportant plusieurs groupes qui sont décrits ci-dessous

- Groupe A : Annexectomies prophylactiques pour risque génétique (mutation BRCA 1 ou 2) ou antécédents familiaux importants de néoplasie sein/ovaires. Nous avons défini ces antécédents familiaux de la manière suivante : 1/ au moins un cancer de l’ovaire familial au 1<sup>er</sup> degré et au moins un cancer du sein familial au 1<sup>er</sup> ou 2<sup>ème</sup> degré et/ou un cancer personnel du sein, ou 2/ au moins deux cancers du sein familiaux au 1<sup>er</sup> ou 2<sup>ème</sup> degré et un antécédent personnel de cancer du sein, et 3/ recherche négative des mutations BRCA 1 et 2. De 35 cas pour les premières publications, nous avons collecté à ce jour 111 cas (51 mutations BRCA1, 22 BRCA2, et 38 antécédents familiaux)
- Groupe B : Annexectomies chez un groupe témoin spontanément fertile et sans antécédents personnels ou familiaux de cancers gynécologiques (sein, ovaire, endomètre) et dont l’examen histopathologique concluait à des ovaires dénués de pathologie cancéreuse ou Borderline. Dans le but de diminuer le facteur confondant représenté par l’exposition à la contraception orale, nous avons retenu les patientes ayant choisi un mode de contraception non hormonal. De 62 contrôles pour les premières publications, nous avons collecté à ce jour 116 témoins
- Groupe C : annexectomies ou kystectomies ovariennes chez 35 patientes ayant bénéficié de protocoles de fécondation in vitro dans le cadre d’infertilité. Deux patientes ont été opérées à deux reprises tant et si bien que la cohorte comporte 37 cas (27 annexectomies et 10 kystectomies ovariennes)

- Groupe D : annexectomies chez 42 patientes sans mutation BRCA et exposées au Tamoxifène.

## **2/ Critères histopathologiques :**

### **Dysplasie ovarienne :**

Notre définition des atypies ovariennes se base sur les précédentes études de dysplasie ovarienne, à savoir, la dysplasie décrite dans les ovaires à risque génétique (ovariectomie prophylactique pour mutation BRCA1/2) [115-118], dans les zones "saines" adjacentes à un cancer de l'ovaire [74, 120], dans l'ovaire controlatéral "d'allure saine" à un cancer de l'ovaire unilatéral [121, 122], et dans les ovaires stimulés [34]. Afin que la méthodologie soit reproductible, nous avons retenu onze critères histopathologiques évalués à la fois sur les ovaires à risque génétique et les ovaires stimulés :

- Pseudostratification épithéliale (Pse)
- Prolifération épithéliale (Pe)
- Papillomatose de surface (Ps)
- Irrégularité de la chromatine nucléaire (Ichn)
- Irrégularité du contour nucléaire (Icn)
- Pléiomorphisme cellulaire (Pc)
- Taille nucléaire (augmentée ou non) (Tn)
- Kystes d'inclusion (Ki)
- Invaginations épithéliales profondes (Iep)
- Psammomes (P)
- Hyperplasie stromale (Hs)

### **Dysplasie tubaire :**

Notre définition d'anomalies tubaires (lésions tubaires intraépithéliales et séreuses ou « STIL ») se base sur les données de la littérature à partir de laquelle nous avons construit une échelle d'évaluation semi-quantitative comprenant deux niveaux de gravité et sept critères histopathologiques [123, 133-135]:

- Pseudostratification épithéliale
- Présence de touffes
- Augmentation de la densité nucléaire
- Présence d'atypies nucléaires
- Dédifférenciation
- Augmentation de la taille nucléaire
- Perte de la ciliation

### **2-1/ Evaluation morphologique :**

Dans chaque cas, la zone la plus anormale était cotée de 0 à 2 (0=normal, 1=modérément anormal, 2=sévèrement anormal).

Un score moyen (score ovarien et score tubaire ) pour chaque patiente était simplement obtenu en ajoutant les niveaux de chacun des 11 items pour l'ovaire (0-22) et des 7 items pour la trompe (0 à 14).

La justification et la validation de ces échelles seront expliquées dans la discussion.

Les lames histopathologiques ont toutes été relues en aveugle par deux pathologistes experts en onco-gynécologie. Quand plusieurs lames étaient disponibles, celle présentant le score le plus élevé était retenue. En cas de divergence manifeste entre les scores établis par chaque pathologiste, une nouvelle lecture collégiale était réalisée afin d'obtenir un consensus.

## **2-2/ Evaluation immunohistochimique (concerne les groupes A, B et D)**

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur des coupes en paraffine de 3  $\mu$ m étalées sur lames silanisées séchées pendant une nuit à 56°C. Les marquages sont effectués dans l'automate Benchmark XT et révélés avec le kit Ultraview DAB (Roche Ventana). Les anticorps utilisés et protocoles associés sont référencés dans le tableau 4 ci-dessous.

L'évaluation semi-quantitative des marquages est effectuée au microscope optique par un pathologiste.

Pour p53, Ki67 et Bcl2, un marquage nucléaire est observé et l'évaluation immunohistochimique a été réalisée grâce à la détermination d'un score immunoréactif (IRS) développé et utilisée pour l'étude des dysplasies ovariennes [136]: ce score quantitatif IRS est défini comme le produit de l'intensité du marquage (de 0 à 3) et du pourcentage de cellules marquées (de 0 à 4). Ce score s'étend donc de 0 à 12. Pour plus de clarté, nous donnerons les résultats statistiques avec p.

Ce score est également utilisé pour  $\gamma$ H2AX qui montre également un marquage nucléaire.

Comme PAX2 n'a jamais été décrit pour les dysplasies, nous avons proposé une analyse descriptive du marquage nucléaire au niveau ovarien et tubaire.

ALDH1 n'ayant jamais été évalué dans la dysplasie tubaire et ovarienne, nous avons proposé une description précise: localisation cellulaire du signal (épithélium/stroma), et expression cytoplasmique/nucléaire, évaluées par le Quick score calculé comme le produit de l'intensité du marquage (de 0 à 3) et du pourcentage de cellules marquées ( de 0 à 100). Ce score s'étend donc de 0 à 300.

Anticorps	Clone	Firme	Prétraitement	Dilution	Incubation
Ki67	MIB-1	DAKO	CC1 court	1/100	32 min
P53	DO-7	DAKO	CC1 court	1/200	32 min
ALDH1	44/ALDH	Biosciences	CC1 court	1/400	60 min
Bcl2	124	DAKO	CC1 standard	1/50	32 min
PAX-2	polyclonal	Invitrogen	CC1 standard	1/100	32 min
H2AX	JBW301	Millipore	CC1 standard	1/50	32 min

Tableau 4: Ki67, P53, ALDH1, bcl2, PAX-2, H2AX

### **3/ microdissection laser [137, 138] :**

Nous avons utilisé le dispositif microdissecteur PixCell II (Artcurus, France) permettant la microdissection laser de cellules d'intérêts à partir de coupes en paraffine ou de tissus congelés. Le système utilise un laser infra-rouge de basse énergie permettant d'activer un film thermosensible se trouvant au-dessus de la population cellulaire spécifique. Le laser n'altère pas l'échantillon tissulaire, la qualité des acides nucléiques et des protéines est normalement conservée ainsi que la morphologie des tissus. Ces cellules visualisées initialement à l'aide d'un microscope Nikon Inversé TiE sont ainsi microdisséquées (le tissu



environnement reste intact sur la lame) et adhèrent au film lorsque la capsule est soulevée du tissu. La capsule est ensuite placée dans un microtube contenant la solution de lyse pour en extraire soit l'ADN, soit l'ARN soit les protéines.

Nous avons choisi d'utiliser des coupes en paraffine et de microdisséquer les cellules morphologiquement dysplasiques du groupe A (trompes et ovaires) et les cellules d'apparence normale du groupe témoin C. Nous avons utilisé le kit d'extraction PicoPure DNA® afin d'extraire l'ADN génomique des cellules microdisséquées.

La qualité et la quantité étant insuffisantes pour réaliser les techniques de biologie moléculaire décrites dans le paragraphe suivant, nous avons à chaque fois poolé l'ADN issu de 5 à 10 coupes entre 12 à 14 µm et ensuite purifié et amplifié l'ADN (protocoles en annexe).

## 4/ Evaluation moléculaire

### 4-1/ Introduction :

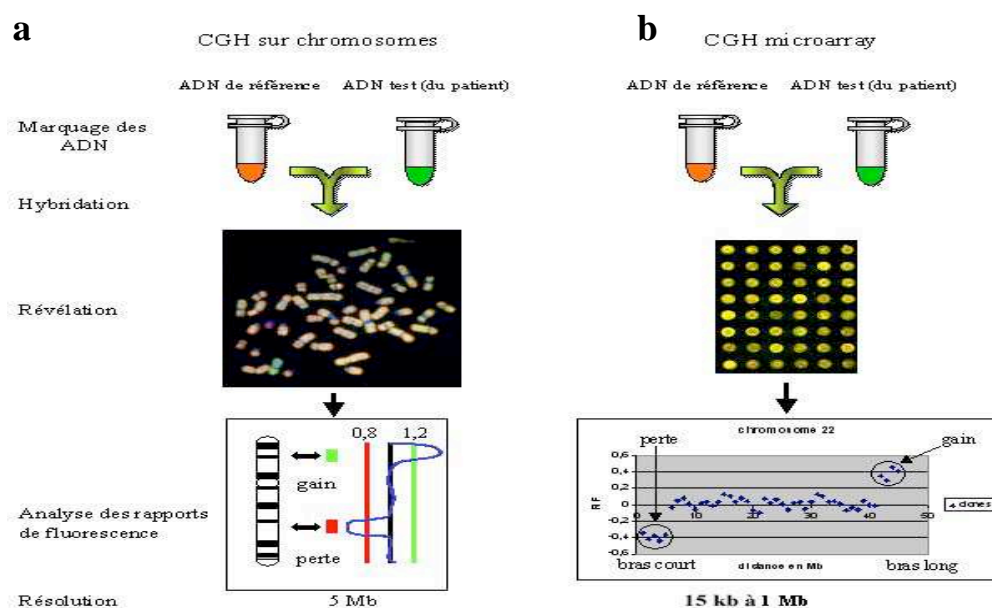
Les altérations chromosomiques dans les cancers humains ont fait l'objet, ces dix dernières années, d'une intensive et fructueuse recherche dont l'impact sur la compréhension des mécanismes de la transformation cellulaire maligne a été tout à fait considérable. La cancérogenèse apparaît ainsi comme le résultat de l'accumulation de réarrangements génomiques conduisant à l'activation d'oncogènes et de voies de signalisation correspondantes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.

La plupart des désordres génomiques résulte du remaniement d'un fragment chromosomique dont la taille est inférieure à 5 Mégabases (Mb) [139]. Ils échappent ainsi au pouvoir de détection des méthodes classiques de l'analyse cytogénétique dont la résolution est comprise entre 5 et 10 Mb selon les techniques utilisées et les tissus étudiés (caryotype). Depuis peu, plusieurs méthodes ont été développées pour détecter des remaniements chromosomiques submicroscopiques dont la taille est inférieure à 5 Mb. Outre les techniques d'exploration ciblée du génome (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)), se sont développées des techniques de cytogénétique moléculaire permettant l'exploration globale du génome, au premier rang desquelles l'hybridation génomique comparative (CGH) qui apparaît aujourd'hui comme la méthode de choix pour la détection des remaniements chromosomiques submicroscopiques, en particulier pour la détection des remaniements intercalaires [140].

La CGH ou Hybridation Génomique Comparative consiste à cohybrider sur une cible la même quantité d'ADN provenant d'un malade et d'un témoin, marquée chacune par un fluorochrome différent [141]. Elle peut s'appliquer sur les chromosomes d'un sujet normal au stade de métaphase. On parle alors de **CGH sur métaphases** (figure 5 a). Elle peut aussi utiliser un support appelé puce sur lequel sont déposés, sous forme de spots, des fragments d'ADN génomiques qui peuvent être de l'ADN extraits de BACs (chromosomes artificiels de bactéries) ou de PACs (chromosomes artificiels de Phage) ou d'une séquence nucléotidique. On parlera alors de **CGH sur puces ou CGH array** (figure 5 b).

Les signaux générés par les deux fluorochromes sont numérisés et un rapport de leur intensité respective (reflétant le rapport de la quantité d'ADN du patient par rapport à celle du témoin) est établi au niveau des bandes de chacune des paires chromosomiques. La CGH sur métaphase quantifie l'ADN génomique d'un patient par rapport à celui d'un témoin (figure 5 a).

Pour la CGH array, le rapport de fluorescence n'est plus calculé selon l'axe des chromosomes mais au niveau de chaque dépôt correspondant au fragment d'ADN fixé. L'interprétation est de ce fait beaucoup plus rapide et automatisable, grâce à différents logiciels permettant un traitement statistique des données et générant une représentation graphique des résultats (figure 5 b).



**Figure 5 : L'hybridation génomique comparative (CGH) [141]**

**Malan et al., 2007**

La CGH quantifie l'ADN génomique d'un patient par rapport à celui d'un témoin soit au niveau des bandes chromosomiques (a), soit au niveau de fragments d'ADN fixés sur une lame (b). (a) CGH sur chromosome ; une quantité d'ADN d'un patient marquée par un fluorochrome donné (rouge) est cohybridée ; avec la même quantité d'ADN d'un témoin marquée par un autre fluorochrome (vert) sur des métaphases normales. Les signaux obtenus sur ces métaphases sont chacun numérisés par une caméra et un rapport d'intensité entre les signaux générés par les deux fluorochromes est établi le long de l'axe de chaque paire chromosomique. (b) CGH sur array d'ADN ; ici la cohybridation est effectuée sur une lame sur laquelle ont été fixés des milliers de fragments d'ADN génomique. L'acquisition et l'analyse sont réalisées au niveau de chaque dépôt d'ADN.

Nous avons réalisé une étude par Hybridation Génomique Comparative (CGH array) sur puces oligonucléotides Agilent hautement résolutive 180 K de 15 annexectomies du groupe à risque génétique A et de 8 témoins positifs (3 STICs dont deux porteurs d'une mutation BRCA1, 5 cancers ovariens sévères de haut grade dont 3 porteurs d'une mutation BRCA1, 1 porteur d'une mutation BRCA2 et 1 non B1 non B2) par rapport à autant de témoins non dysplasiques et non cancéreux du groupe B. Nous avons volontairement choisi d'étudier en CGH array les cas morphologiquement les plus dysplasiques et avons ciblé cette série dans le sous-groupe porteur de mutations BRCA1.

La mise au point a été délicate pour deux raisons principales: optimisation de la microdissection difficile et longue à obtenir d'une part (faible quantité de cellules dysplasiques), et d'autre part, mauvaise qualité des prélèvements (coupes en paraffine). Il a ainsi fallu ajouter une étape d'amplification afin d'augmenter la quantité d'ADN. Pour l'analyse en CGH Array, la technologie Agilent a été choisie avec l'utilisation d'une lame 4x180K (résolution moyenne de 15 KB). Sur chaque lame, nous étudions 2 cas. Chaque cas étant hybridé 2 fois sur la lame, une fois marqué en Alexa 3 et une fois marqué en Alexa 5 dans les mélanges d'ADN lors de l'hybridation. Les protocoles de marquage et d'hybridation sont détaillés en annexe. Les images issues de la lecture des lames par un scanner Agilent ont été analysées, dans un premier temps, avec le logiciel « *Feature Extraction* » qui reconnaît les régions fluorescentes, détermine l'intensité des signaux fluorescents et compile les résultats dans un listing qui relie le signal fluorescent de chaque spot de la lame au nom de l'oligonucléotide, sa double position sur la lame et sa position dans le génome et normalise l'intensité des ratios Alexa5/Alexa3 pour chaque lame et chaque point de données, puis avec le logiciel « *CGH analytics* (v3.4) » pour l'interprétation des résultats (Agilent) .

#### **4-2/ Stratégie d'analyse des profils de CGH array**

Chaque ADN étant hybridé 2 fois, une fois marqué en Alexa 5 et une fois marqué en Alexa 3 dans les mélanges d'ADN lors de l'hybridation, les rapports d'intensité respectifs pour cet ADN sont importés (reflétant le rapport de la quantité d'ADN de l'individu d'intérêt marqué en Alexa 5 par rapport à celle d'un ADN marqué en Alexa 3 et inversement) dans le logiciel DNA analytics (Agilent). Ce logiciel permet d'établir un profil d'analyse de CGH Array en miroir avec les ratios en log (2) du rapport Alexa5/Alexa3 pour les 2 expériences. A partir des résultats de la CGH array, une cartographie du génome indique pour chaque cas les délétions

et les amplifications existantes. Le logiciel DNA analytics, génère un rapport, sous forme de fichier excel, des anomalies retrouvées, prenant comme seuil anormal les ratios  $\log(2) >$  ou  $<$  respectivement à 0,25 et  $-0,25$  pour 3 spots consécutifs. Pour chaque individu, 2 tableaux sont générés et correspondent au mélange Alexa 5/ alexa3 avec l'ADN d'intérêt marqué une fois en Alexa 5 et une fois en Alexa 3. Pour chaque tableau, les régions ayant moins de 3 spots consécutifs et n'étant pas retrouvées en miroir sur les 2 expériences sont éliminées. Pour identifier s'il s'agit d'une amplification ou d'une délétion, seuls les résultats du tableau corrigé lorsque l'individu d'intérêt est marqué dans le mélange d'hybridation en Alexa 5 sont pris en compte. On retrouve les remaniements observés par chromosome ainsi que leur position sur celui-ci, la taille en kb, le nombre de sondes impliquées et la valeur du ratio de  $\log(2)$  pour l'amplification ou la délétion. Les régions chromosomiques remaniées sont comparées aux CNV polymorphes connus dans les différentes bases de données grâce à un site développé par la plateforme ouest génomique de Nantes (<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/madtools/home/>) et un logiciel appelé Madmix. Ce logiciel permet de générer un rapport dans lequel est signifié pour chaque région retrouvée anormale, si elle est incluse, chevauchante ou exclue de régions décrites comme polymorphes dans les bases de données existantes de CNV (Database of Genomic Variants (DGV)) et sur leur propre base qu'ils ont générée avec leurs patients. Dans ce fichier, pour les régions non polymorphes une liste des gènes inclus dans ces régions est créée. Ces informations sont reportées sur un tableau final pour chaque patient permettant de définir les régions d'intérêts, c'est-à-dire, les régions retrouvées avec un ratio  $> 0,58 [\log(2) 3/2]$  ou  $< -1 [\log(2) 1/2]$ , sur 3 spots consécutifs, non polymorphes.

## **Analyse statistique :**

Les tests statistiques ont fait appel aux comparaisons de moyennes à l'aide du test de Student pour les scores morphologiques et à l'aide du test non paramétrique de Wilcoxon pour l'évaluation immunohistochimique.

L'analyse moléculaire des résultats en CGH array a été descriptive (cohorte numériquement faible).

L'analyse des longueurs télomériques a nécessité l'utilisation du test non paramétrique H de Kruskal Wallis.

## **Résultats :**

Le groupe A est composé de 111 cas répartis ainsi : 51 mutations BRCA1, 22 mutations BRCA2, et 38 antécédents familiaux de cancers sein/ovaire.

L'âge moyen du groupe A était de 49 ans +/- 6.8 et de 47 +/- 7.4 pour le groupe B (pas de différence significative)

### **1/ Analyse morphologique : groupe A versus groupe B**

**Dysplasie ovarienne :** les anomalies cytologiques et architecturales ont toujours été évaluées au niveau de l'épithélium ovarien de surface.

Groupe A (annexectomie à risque génétique) vs groupe B (témoin) :

Toutes les anomalies étaient statistiquement plus fréquentes dans le groupe A que dans le groupe B. Les anomalies les plus représentatives du groupe à risque génétique étaient les kystes d'inclusion (81.4%), les invaginations corticales (77.7%), l'hyperplasie stromale (68.5%) et la pseudostratification épithéliale (68.5%) (cf tableau 7). Les anomalies histopathologiques sont par contre rares dans le groupe B à l'exception des kystes d'inclusion (51.7%). D'autre part, les anomalies étaient davantage marquées chez les patientes à risque génétique avéré (mutations BRCA) par rapport aux seuls antécédents familiaux de cancers ovariens/ seins.

A partir de ces observations, un score moyen de dysplasie a été déterminé : 8.8 pour le groupe A vs 3.12 pour les témoins., la différence étant statistiquement significative ( $p < .0001$ ). Au sein du groupe A, les porteurs de la mutation BRCA avaient un score significativement plus sévère que les seuls antécédents familiaux (9.73 vs 7.13,  $p = 0.0007$ ).

**Dysplasie tubaire :** Les anomalies cytologiques et architecturales épithéliales tubaires étaient plus fréquentes dans le groupe A que dans le groupe témoin (cf tableau 8). Le score de dysplasie tubaire moyen était de 6.54 pour le groupe A contre 1.58 pour le groupe B ( $p < .0001$ ). On retrouvait également une gradation en fonction du statut BRCA : le score atteignait 7.07 en cas de mutation BRCA contre 5.5 pour les seuls antécédents familiaux ( $p = 0.0012$ ).

On précise qu'aucun cas de salpingite n'a été détecté. Par ailleurs 3 cas de cancers occultes (deux cancers ovariens et un cancer tubaire ont été découverts et exclus de cette analyse morphologique afin de ne pas fausser le score moyen (l'analyse morphologique a été déterminée pour identifier les lésions pré-malignes potentielles)

Critères histopathologiques	Groupe A : annexectomies prophylactiques (n= 108) - Groupe BRCA+(n= 70) - Groupe BRCA- (n= 38)	Groupe B : témoins (n=116)	P
Pseudostratification épithéliale	74 (68.5%) BRCA+ : 50 (71.4%) BRCA- : 24 (63.1%)	54 (46.5%)	0.0006 0.0006 0.0756
Prolifération épithéliale	71 (65.7%) BRCA+ : 48 (68.5%) BRCA- : 23 (60.5%)	35 (30.1%)	<.0001 <.0001 0.0008
Papillomatose de surface	66 (61.1%) BRCA+ : 48 (68.5%) BRCA- : 18 (47.3%)	27 (23.2%)	<.0001 <.0001 0.0046
Irrégularité de la chromatine nucléaire	62 (57.4%) BRCA+ : 47 (67.1%) BRCA- : 15 (39.4%)	21 (18.1%)	<.0001 <.0001 0.0069
Irrégularité du contour nucléaire	59 (54.6%) BRCA+ : 46 (65.7%) BRCA- : 13 (34.2%)	35 (30.1%)	0.0002 <.0001 0.6636
Pleomorphisme cellulaire	60 (55.5%) BRCA+ : 44 (62.8%) BRCA- : 16 (42.1%)	36 (31%)	0.0002 <.0001 0.2104
Augmentation taille nucléaire	46 (42.5%) BRCA+ : 38 (54.2%) BRCA- : 8 (21%)	22 (18.9%)	<.0001 <.0001 0.7780
Kystes d'inclusion	88 (81.4%) BRCA+ : 60 (85.7%) BRCA- : 28 (73.6%)	60 (51.7%)	<.0001 <.0001 0.0176
Invaginations corticales profondes	84 (77.7%) BRCA+ : 59 (84.2%) BRCA- : 25 (65.7%)	42 (36.2%)	<.0001 <.0001 0.0014
psammomes	58 (53.7%) BRCA+ : 45 (64.2%) BRCA- : 13 (34.2%)	13 (11.2%)	<.0001 <.0001 0.001
Hyperplasie stromale	74 (68.5%) BRCA+ : 56 (80%) BRCA- : 18 (47.3%)	29 (25%)	<.0001 <.0001 0.0094

Tableau 7 : Evaluation morphologique ovarienne. Les 3 carcinomes occultes ont été exclus de l'analyse morphologique



Critères histopathologiques	Groupe A : annexectomies prophylactiques (n= 108) Groupe BRCA+(n= 70) Groupe BRCA- (n= 38)	Groupe B : témoins (n=116)	P
Pseudostratification épithéliale	79 (73.1%) BRCA+ : 57 (81.4%) BRCA- : 22 (57.8%)	56 (48.2%)	0.0001 <.0001 0.3033
Présence de touffes	46 (42.5%) BRCA+ : 38 (54.2%) BRCA- : 8 (21%)	13 (11.2%)	<.0001 <.0001 0.1248
Perte de la polarité nucléaire	68 (62.9%) BRCA+ : 53 (75.7%) BRCA- : 15 (39.4%)	26 (22.4%)	<.0001 <.0001 0.0389
Augmentation de la densité nucléaire	64 (59.2%) BRCA+ : 50 (71.4%) BRCA- : 14 (36.8%)	14 (12%)	<.0001 <.0001 0.0163
Atypies nucléaires	69 (63.8%) BRCA+ : 50 (71.4%) BRCA- : 19 (50%)	11 (9.4%)	<.0001 <.0001 <.0001
Augmentation de la taille nucléaire	64 (59.2%) BRCA+ : 49 (70%) BRCA- : 15 (39.4%)	14 (12%)	<.0001 <.0001 0.0002
Perte de la ciliation	71 (65.7%) BRCA+ : 57 (81.4%) BRCA- : 14 (36.8%)	7 (6%)	<.0001 <.0001 0.0074

Tableau 8: Evaluation morphologique tubaire. Les 3 carcinomes occultes ont été exclus de l'analyse morphologique

## 2/ Analyse immuno-histochimique : groupe A versus groupe B

L'expression de Ki67 et p53 apparaissait faible à modérée au niveau ovarien dans le groupe A tout en étant statistiquement significative en comparaison du groupe témoin ( $0.63 \pm 0.68$  vs  $0.13 \pm 0.35$ ,  $p < 0.0002$  pour Ki67 et  $0.56 \pm 0.17$  vs  $0.17 \pm 0.38$ ,  $p = 0.0002$  pour p53) (cf tableau 9).

Au niveau tubaire, l'expression apparaissait plus marquée et statistiquement significative par rapport aux témoins ( $1.25 \pm 1.41$  vs  $0.20 \pm 0.41$   $p < 0.0001$  pour Ki67 et  $1.75 \pm 1.74$  vs  $0.31 \pm 0.47$ ,  $p < 0.0001$  pour p53). On retrouvait par ailleurs un profil d'expression tubaire et ovarien différent pour ces deux marqueurs en fonction du statut BRCA.

L'expression ovarienne et tubaire de Bcl2 était modérée dans le groupe A par rapport aux témoins. Par contre, le profil d'expression était similaire qu'il y ait mutation BRCA ou seulement des antécédents familiaux.

L'expression nucléaire de PAX2 apparaît de faible intensité au niveau des cellules dysplasiques tubaires : elle est souvent diffuse mais reste toujours très faible. Au niveau de l'épithélium ovarien, on constate une extinction complète du marquage alors que l'intensité est modérée et l'expression diffuse au niveau des kystes d'inclusion ovariens.

L'expression d'ALDH1 est apparue spécifique de la dysplasie: au niveau des cellules épithéliales ovariennes et tubaires morphologiquement non dysplasiques, l'expression d'ALDH1 était faible et comparable aux épithéliums témoins du groupe B. En revanche, au niveau des cellules morphologiquement dysplasiques ovariennes ou tubaires, son expression était fortement positive, et était localisée plus souvent au niveau cytoplasmique que nucléaire. Au niveau stromal, ALDH1 était toujours présent (fort marquage nucléaire et cytoplasmique dans les groupes A et B) et constituait ainsi notre contrôle interne.

Enfin, l'expression d'ALDH1 était constamment basse dans les 3 carcinomes occultes du groupe A alors que l'expression de Ki67 et p53 était forte.

Marqueurs	P : groupe A vs groupe B	P : groupe BRCA+ vs group BRCA-
Ki 67		
• ovaire	<.0002	<.0001
• trompe	<.0001	0.0006
P53		
• ovaire	0.0002	0.0055
• trompe	<.0001	0.0033
Bcl2		
• ovaire	<.0001	0.29
• trompe	<.0001	0.42

Tableau 9 : résultats immunohistochimiques

### 3/ Analyse morphologique : groupe D versus groupe B

Les indications d'annexectomie dans le groupe Tamoxifène étaient représentées dans 80% des cas par la découverte échographique d'un kyste ovarien. Dans les 20% restant,

l'annexectomie était systématiquement associée à l'hystérectomie réalisée pour métrorragie et/ou mise en évidence échographique d'un épaississement de l'endomètre. Toutes les annexectomies ont eu lieu entre 4 à 7 années après la première prise de Tamoxifène.

Aucun cas de cancer endométrial n'a été mis en évidence dans cette série de 42 annexectomies. Par contre, on retrouvait deux cancers ovariens, qui ont été exclus de l'analyse morphologique.

**Dysplasie ovarienne :**

Dans le groupe Tamoxifène, les anomalies les plus fréquentes étaient représentées par les psammomes et l'hyperplasie stromale. Le score de dysplasie ovarienne était de 3.62 pour le groupe TAM contre 3.12 pour les témoins (non significatif) (cf tableau 10).

Critères histopathologiques	Groupe D : (n= 40)	Groupe B : témoins (n=116)	P
Pseudostratification épithéliale	23 (57.5%)	54 (46.5%)	0.24
Prolifération épithéliale	12 (30%)	35 (30.1%)	0.93
Papillomatose de surface	14 (35%)	27 (23.2%)	0.12
Irrégularité de la chromatine nucléaire	13 (32.5%)	21 (18.1%)	0.054
Irrégularité du contour nucléaire	7 (17.5%)	35 (30.1%)	0.371
Pleomorphisme cellulaire	13 (32.5%)	36 (31%)	0.515
Augmentation taille nucléaire	5 (12.5%)	22 (18.9%)	0.513
Kystes d'inclusion	24 (60%)	60 (51.7%)	0.196
Invaginations corticales profondes	17 (42.5%)	42 (36.2%)	0.324
psammomes	22 (55%)	13 (11.2%)	<.001
Hyperplasie stromale	28 (70%)	29 (25%)	<.0001

Tableau 10 : Evaluation morphologique ovarienne. Les 2 cancers ovariens ont été exclus de l'analyse morphologique

### Dysplasie tubaire :

Les différentes anomalies histopathologiques étaient plus fréquentes dans le groupe TAM (cf tableau 11). Le score de dysplasie tubaire atteignait 7.5 contre 1.58 pour les témoins ( $p < 0.007$ ).

Critères histopathologiques	Groupe D (n= 40)	Groupe B : témoins (n=116)	P
Pseudostratification épithéliale	36 (90%)	56 (48.2%)	0.0001
Présence de touffes	32 (80%)	13 (11.2%)	<.0001
Perte de la polarité nucléaire	36 (90%)	26 (22.4%)	<.0001
Augmentation de la densité nucléaire	35 (87.5%)	14 (12%)	<.0001
Atypies nucléaires	20 (50%)	11 (9.4%)	<.0001
Augmentation de la taille nucléaire	34 (85%)	14 (12%)	<.0001
Perte de la ciliation	34 (85%)	7 (6%)	<.0001

Tableau 11: Evaluation morphologique tubaire. Les cancers ovariens ont été exclus de l'analyse morphologique

### 4/ Analyse immunohistochimique : groupe D versus groupe B

Au niveau ovarien, Ki67 et p53 étaient faiblement exprimés dans le groupe TAM, la différence étant statistiquement significative par rapport au groupe témoin (cf tableau 12). Le marquage était prépondérant au niveau des kystes d'inclusion et des invaginations épithéliales, et significativement moins intense au niveau de l'épithélium ovarien de surface. Au niveau tubaire, l'expression de Ki67 et p53 apparaissait plus marquée.

ALDH1 semblait spécifique des cellules morphologiquement dysplasiques ovariennes et tubaires en étant fortement positif alors qu'il était absent au niveau des cellules d'apparence normale. Au niveau stromal, ALDH1 était toujours présent dans les deux groupes et constituait ainsi notre contrôle interne. L'expression d'ALDH1 était constamment basse pour les deux cancers du groupe TAM alors que p53 et Ki67 étaient fortement marqués.

Marqueurs	P : groupe D vs groupe B
Ki 67	
• ovaire	<.0001
• trompe	<.0001
P53	
• ovaire	0.0047
• trompe	<.0001

Tableau 12: résultats immunohistochimiques

**Les résultats concernant le groupe C (stimulation de l'ovulation) sont donnés dans les articles.**

## 5/ Résultats moléculaires : cf tableaux 13 à 16

L'interprétation des résultats est double et comparative faisant appel à la bio-informatique et à la lecture visuelle par l'opérateur. Les résultats sont finalement vérifiés à l'aide de bases de données (UCSC Genome Browser qui est une base de données pour le génome entier et Database of Genomic Variants, Toronto, Canada qui est une base de données de polymorphismes ou CNV).

On retrouve des remaniements à type de délétions ou d'amplifications sur la totalité des cas de dysplasie étudiés. Certains réarrangements correspondent à des CNV. Certaines localisations correspondent à des gènes impliqués dans le système de réparation de l'ADN, et/ou dans les voies de transcription et régulation de différentes cytokines (NET 56 en *17p13.1*, ARIH2 en *3p21*, hLMB1 en *12p13.31*, MIM135A2 en *12q23.1*, RAG1, RAG2, C11orf74 en *11p12*, Mus Myt1 en *2q25.3*, NFATC1 en *18q23*, Bos BRAT1 en *7p22.3-p22.2*, RPTOR en *17q25.3*, HDAC10 en *22q13.33*, PTHLH en *12p11.23*). On retrouve également des gènes impliqués dans la cancérogenèse : TIMP2 et C1qTNF1 (Tumor necrosis factor) en *17q25.3*, ING4 (impliqué dans la voie de signalisation p53) en *12p13.31*. Enfin, certains gènes interagissent avec le système des acides rétinoïques : ITGB3BP (co-activateur des récepteurs nucléaires rétinoïques) en *1p31.3*, NCOR2 (co-répresseur des acides rétinoïques) en *12q24.31*. Même s'il n'apparaît pas de régions récurrentes pour l'ensemble de la cohorte, on retrouve malgré tout des remaniements communs pour certains cas au niveau tubaire : *1q21.1-q21.2*, *14q32.2-q32.33*, *15q11.2*, *20q13.2*. Les régions *14q32.2-q32.33* et *20q13.2* contiennent respectivement DOK5 qui est un facteur de transduction cellulaire et TRAF3 qui interagit avec TNF.

D'autre part, on retrouve des réarrangements concernant des régions communes entre les cas de dysplasie tubaire et ovarienne qui vont dans le même sens (soit délétion, soit amplification) à l'exception des régions *4q13.2* et *6p21.32*. La taille des réarrangements est souvent limitée pour les cas de dysplasie contrairement aux cancers où ils concernent des pans entiers chromosomiques (ch 6, ch11, ch12, ch16, ch17, ch19, ch22). Enfin, on retrouve quelques réarrangements de grande taille (>300 Kb) au niveau des cas de dysplasie qui sont également présents dans les cas de cancers.

Chr	Région	Début	Fin	Taille (Kb)	Délétion	Amplification	CNV
chr1	p31.1	72541243	72568209	26,966	x		x
chr1	q21.3	150822873	150853058	30,185		x	x
chr1	p36.23	7413464	7450234	36,77	x		x
chr1	q21.1	103899571	104012720	113,149	x		x
chr3	q21.2	127266853	127302365	35,512		x	x
chr3	q26.1	163997028	164101976	104,948	x		x
chr4	q13.2	69074940	69145174	70,234	x		x
chr4	q12	57844840	58164289	319,449	x		x
chr6	p21.32	32558477	32650872	92,395		x	x
chr6	q27	169528139	169657509	129,37		x	
chr8	p11.23	39368309	39482185	113,876	x		x
chr9	q34.3	138497671	139238547	66		x	
chr11	p13	33539880	33569813	29,933		x	
chr11	q11	55134286	55167675	33,389	x		x
chr11	p15.5 - p15.4	246499	3200334	239	x		x
chr12	q23.1	96475324	96548424	73,1	x		
chr12	p11.23 - p11.22	27476739	28002887	526,148		x	
chr14	q11.2	20286248	20309106	22,858	x		x
chr14	q32.33	105856772	105881877	25,105	x		x
chr15	q11.2	18741516	20060261	1318,745	x		x
chr16	p12.3	19245182	19374854	129,672	x		
chr16	p13.2	8721564	8877353	155,789		x	
chr16	p11.2	32518465	33533640	1015,175	x		x
chr17	p13.1	7079058	7094865	15,807		x	
chr17	q25.3	76586603	77609371	80		x	
chr17	q21.31	41466411	41700962	234,551	x		x
chr19	q13.32	51606138	51691597	85,459	x		
chr20	q13.33	59942509	62323906	201		x	
chr22	q13.31	44809554	44840449	30,895		x	x
chr22	q11.23	22677759	22720395	42,636	x		x
chr22	q11.21	18086857	18691904	72		x	x
chrX	q23	111003507	111023985	20,478	x		
chrX	p22.13	18269664	18370266	100,602	x		

Tableau 13 : Réarrangements chromosomiques mis en évidence sur la série de dysplasie ovarienne ; en vert sont notés les réarrangements récurrents

Ch	Région	Début	Fin	Taille (Kb)	Délétion	Amplification	CNV
chr1	p22.1	93195246	93215894	20,648	x		
chr1	p31.1	72541243	72568209	26,966	x		x
chr1	p31.3	63728126	63851162	123,036	x		
chr1	p33	49701812	49760863	59,051	x		x
chr1	p36.33 - p36.32	791219	3508668	2717,449		x	
chr1	q21.1 - q21.2	147308357	148125598	817,241	x		
chr1	q21.3	150822873	150853058	30,185		x	x
chr1	q32.3	211126870	211155382	28,512	x		
chr1	q44	246794352	246852326	57,974	x		x
chr2	p16.1	55774427	55843175	68,748	x		x
chr2	p22.2	37839135	37889029	49,894	x		
chr2	p23.3	25242933	25453822	210,889	x		x
chr2	p24.3 - p24.2	16875551	17340087	464,536		x	
chr2	p25.3	2299774	2317481	17,707	x		
chr2	q37.3	237607658	242677269	5069,611		x	
chr3	p21.31	48920494	48946665	26,171		x	
chr3	p25.3	9397287	9432343	35,056	x		
chr3	q12.1	100109550	100574904	465,354	x		
chr3	q26.1	164038717	164077488	38,771		x	x
chr3	q29	196777540	197118567	341,027	x		x
chr4	p16.3 - p16.2	483176	3842319	3359,143	x		
chr4	q13.2	69097136	69120976	23,84		x	x
chr4	q21.3	87217465	87247834	30,369	x		
chr4	q35.2	189846035	189928002	81,967		x	x
chr5	p15.33	12140419	12313251	172,832		x	
chr5	q22.1	110672041	110770600	98,559		x	
chr5	q31.2	135661184	135679532	18,348	x		
chr5	q33.2	155403862	155460088	56,226		x	
chr6	p11.2	57200335	57297353	97,018		x	
chr6	p21.32	33437691	33464523	26,832	x		x
chr6	p22.1	27238560	27326348	87,788		x	
chr6	q14.1	79035691	79080188	44,497		x	x
chr6	q15	90722401	90745065	22,664	x		x
chr6	q22.1	116586584	116634719	48,135		x	
chr7	p22.3 - p22.2	160441	3049040	2888,599		x	
chr7	q11.22	69095110	69142374	47,264	x		x
chr7	q21.11	77723599	77774049	50,45	x		
chr7	q31.32	123365851	123414756	48,905	x		
chr7	q33	134972470	135004237	31,767	x		
chr8	p11.23	39356395	39494087	137,692	x		x
chr8	p23.1	7226701	7824259	597,558	x		x
chr8	p23.2	10428033	10559464	131,431		x	
chr8	q13.2	69028886	69087079	58,193		x	
chr8	q24.23	136914179	138016580	1102,401		x	



chr9	q21.13	78814571	79144546	329,975		x	
chr9	q33.3 - q34.3	129280827	140029020	10748,193		x	
chr10	q21.1	55286723	55309155	22,432	x		x
chr11	p12	36528233	37627435	1099,202		x	
chr11	p15.2	15136274	15170314	34,04	x		
chr11	p15.5 - p15.4	246499	3200334	2953,835	x		
chr11	q12.3	62867046	62894364	27,318	x		
chr12	p13.31	9528390	9554349	25,959	x		x
chr12	q24.31	123429051	123614078	185,027		x	
chr12	q24.33	130643992	130669637	25,645	x		x
chr13	q22.1	72445557	72566135	120,578	x		
chr13	q34	113790951	113862214	71,263		x	
chr14	q11.2	20272898	20320061	47,163	x		x
chr14	q21.2 - q21.3	42950861	43293764	342,903	x		
chr14	q21.3	47856323	47887591	31,268	x		x
chr14	q32.2 - q32.33	99029359	105481723	6452,364		x	
chr15	q11.2	18741516	20060261	1318,745	x		
chr15	q13.3	29375979	29626968	250,989		x	x
chr16	p11.2	31782082	33648056	1865,974	x		x
chr16	p12.3	19245182	19374854	129,672	x		
chr16	p13.3	972757	1054235	81,478	x		
chr16	q22.1	65484408	69381255	3896,847		x	
chr16	q23.3 - q24.3	82387074	88676035	6288,961		x	
chr17	p11.2	20642945	20751079	108,134	x		
chr17	q11.2 - q12	28769234	29521833	752,599	x		
chr17	q24.1	61184813	61220398	35,585	x		
chr17	q25.3	76471814	78100423	1628,609		x	
chr18	p11.22	9494136	10405890	911,754		x	
chr18	q21.33	57650652	57700760	50,108		x	
chr18	q23	75220861	75803759	582,898		x	
chr19	p13.3 - p13.11	252158	19649004	19396,846		x	
chr19	q13.32	51606138	51691597	85,459	x		
chr20	q13.12	43388017	43415783	27,766		x	
chr20	q13.2	52628794	52700870	72,076		x	
chr20	q13.33	60027365	62223344	2195,979		x	
chr21	q21.1	15326190	15380587	54,397		x	
chr21	q22.3	41814284	46846387	5032,103		x	
chr22	q11.21	18447113	18686972	239,859		x	
chr22	q11.23	22677759	22720395	42,636	x		x
chr22	q13.33	48706932	49427713	720,781		x	
chrX	p11.23	48253465	48281054	27,589		x	x
chrX	p22.13	18269664	18370266	100,602	x		
chrX	p22.32	5262556	5317495	54,939	x		x
chrX	q21.31	87932484	88091682	159,198	x		

chrX	q23	111003507	111023985	20,478	x		
------	-----	-----------	-----------	--------	---	--	--

Tableau 14 : Réarrangements chromosomiques mis en évidence sur la série de dysplasie tubaire ; en vert sont notés les réarrangements récurrents

Chromosome	Région	Début	Fin	Taille (Kb)	Délétion	Amplification
chr1	p31.1	72541243	72568209	26,966	x	
chr1	q21.3	150822873	150853058	30,185		x
chr4	q13.2	69074940	69145174	70,234	x ovaire	x trompe
chr6	p21.32	32558477	32650872	92,395	x trompe	x ovaire
chr9	q34.3	138497671	139238547	66		x
chr11	p15.5 - p15.4	246499	3200334	239	x	
chr14	q11.2	20286248	20309106	22,858	x	
chr16	p12.3	19245182	19374854	129,672	x	
chr16	p11.2	32518465	33533640	1015,175	x	
chr17	q25.3	76586603	77609371	80		x
chr19	q13.32	51606138	51691597	85,459	x	
chr20	q13.33	59942509	62323906	201		x
chr22	q13.31	44809554	44840449	30,895		x
chr22	q11.23	22677759	22720395	42,636	x	
chr22	q11.21	18086857	18691904	72		x
chrX	q23	111003507	111023985	20,478	x	
chrX	p22.13	18269664	18370266	100,602	x	

Tableau 15 : Réarrangements chromosomiques communs entre dysplasie tubaire et ovarienne

Chromosome	Région	Délétion	Amplification
chr1	p31.1	x	
chr11	p15.5 - p15.4		x
chr15	q11.2	x	
chr16	p11.2	x	
chr20	q13.33		x

Tableau 16 : Réarrangements chromosomiques communs entre cancers et dysplasie

## Discussion :

### 1/ Analyse morphologique

#### 1-1/ La dysplasie ovarienne :

L'aspect macroscopique des pièces d'ovariectomies prophylactiques est bien souvent normal. Cependant, l'examen anatomopathologique attentif de l'ensemble de l'ovaire est susceptible de mettre en évidence des modifications cytologiques et architecturales fines, basées sur une évaluation subjective du pathologiste, ce qui rend nécessaire l'établissement de scores.

Plusieurs échelles de mesure ont été décrites :

\*le score de Salazar [115], basé sur la présence d'au moins trois des critères suivants : kystes d'inclusion, pseudostratification épithéliale, papillomatose de surface, invaginations profondes, hyperplasie stromale. La sensibilité serait de 75%, la spécificité de 90%. La sensibilité augmenterait à 85% si l'on considère seulement deux critères.

\*le score de Plaxe [120], considère comme nécessaire et suffisant la présence des quatre critères suivants pour affirmer le diagnostic de dysplasie de l'ovaire avec une sensibilité de 98% et une spécificité de 100%: perte de polarité, stratification épithéliale, pléiomorphisme cellulaire, distribution irrégulière de la chromatine.

Ces deux échelles d'évaluation de la dysplasie ont l'avantage d'être simples mais l'inconvénient majeur d'être incomplètes (aucun critère nucléaire pour Salazar et al [115], et aucun critère basé sur la physiopathologie de la dysplasie comme kystes d'inclusion, invaginations épithéliales profondes et hyperplasie stromale pour Plaxe et al [116]) et de ne pas faire état de la sévérité de chacune des anomalies (échelles d'évaluation uniquement qualitatives).

\*le score de Nieto [34], décrit pour la dysplasie des ovaires stimulés, a l'avantage d'être à la fois qualitatif (basé sur 9 critères cytologiques et nucléaires) et quantitatif (basé sur 2 niveaux de sévérité). Pourtant, ce score ne tient pas compte des kystes d'inclusion, invaginations épithéliales profondes et hyperplasie stromale, alors que ces critères apparaissent pourtant fondamentaux dans la physiopathologie de la dysplasie. D'autre part, aucun seuil de dysplasie n'est défini.

\*le score de Clermont-Ferrand (tableau 17): Notre score reprend l'ensemble des items décrits dans les études précédentes - à savoir, la dysplasie décrite dans les ovaires à risque génétique

(ovariectomie prophylactique pour mutation BRCA1/2) [115-117], dans les zones "saines" adjacentes à un cancer de l'ovaire [74, 120], dans l'ovaire controlatéral "d'allure saine" à un cancer de l'ovaire unilatéral [121, 122], et dans les ovaires stimulés [34]-, afin d'obtenir un score exhaustif (11 critères histopathologiques) et reproductible .

Cette échelle offre à la fois une description cytologique et architecturale de la dysplasie (analyse qualitative) et permet également une évaluation quantitative grâce à deux niveaux de sévérité des anomalies. La pertinence métrologique de cette échelle est démontrée par la reproductibilité, la concordance des résultats lors de l'analyse par différents pathologistes, et la validité clinico-pathologique. Nous avons utilisé ce score pour caractériser la dysplasie au niveau des ovaires à risque génétique ainsi qu'au niveau des ovaires stimulés [25, 35, 36].

Dans les deux cas, le score moyen de dysplasie était significatif par rapport à une population témoin, avérant la présence de dysplasie. Nous avons également comparé le profil de dysplasie entre les ovariectomies prophylactiques pour risque génétique et les ovaires stimulés dans le cadre de protocole de FIV : le profil est différent ce qui laisserait présager une évolution différente (le cancer invasif pour les ovaires à risque génétique et peut-être les tumeurs borderlines pour les ovaires stimulés, comme semblent le montrer les séries épidémiologiques de suivi de patientes stimulées) [36, 37].

La différence de profils justifie l'utilisation exhaustive des 11 critères de notre échelle (intérêt de la description qualitative). De plus, on constate une gradation significative dans la sévérité de la dysplasie entre les ovaires mutés par rapport aux ovaires avec antécédents familiaux sans mutation BRCA (dysplasie d'autant plus sévère que le risque de cancer est important : 11,6 pour BRCA 1 ; 7,6 pour BCRA 2 ; 7,1 pour antécédents familiaux) : cet élément tendrait à confirmer le caractère pré-invasif de la dysplasie d'une part, et d'autre part l'intérêt d'une échelle d'évaluation quantitative avec les deux niveaux de sévérité.

Enfin, à l'aide d'une courbe ROC, nous avons établi la valeur seuil minimale ayant une différence statistiquement significative avec les témoins et permettant ainsi de s'affranchir d'un groupe contrôle: ce cut off est à 8 (sensibilité : 60% ; spécificité : 93,3%). L'idéal serait d'obtenir une sensibilité et une spécificité égales à 1, ce qui n'est généralement pas possible car les deux paramètres varient en sens inverse. Nous avons volontairement choisi une spécificité élevée afin de ne pas conclure au diagnostic de dysplasie pour des ovaires normaux non dysplasiques. Autrement dit, en se basant sur notre échelle, la mise en évidence d'un score supérieur à 8 permettrait le diagnostic de dysplasie et, dans tous les cas devrait alerter le pathologiste (cf articles en annexe).

	Score décrit dans les ovaires à risque génétique (ovariectomie prophylactique) [115-117]	Score décrit dans les zones "saines" adjacentes à un cancer de l'ovaire [74, 120]	Score décrit dans l'ovaire controlatéral "sain" à un cancer de l'ovaire unilatéral [121, 122]	Score décrit dans les ovaires stimulés par Nieto et al [34]	Notre score*
Pseudostratification épithéliale	✓	✓	✓	✓	✓
Prolifération épithéliale				✓	✓
Anomalies nucléaires		✓	✓	✓	✓
Pléiomorphisme cellulaire		✓		✓	✓
Papillomatose de surface	✓		✓		✓
Kystes d'inclusion	✓		✓		✓
Psammomes	✓		✓		✓
Invaginations épithéliales profondes	✓		✓		✓
Hyperplasie stromale	✓		✓		✓

Tableau 17 : comparaison des différentes échelles de dysplasie ovarienne existant dans la littérature

\*le score morphométrique :

Un des inconvénients majeurs du score histopathologique réside dans la subjectivité de la détermination de ce score : les anomalies sont difficiles à identifier et reposent sur l'expérience de l'anatomopathologiste puisqu'aucun critère ou score n'est unanimement reconnu (contrairement à la dysplasie cervicale).

L'analyse morphométrique a été initialement utilisée pour l'étude des cancers invasifs et les tumeurs borderlines de l'ovaire [142]. Elle a ensuite été adaptée par l'équipe de Deligdisch [142] pour l'évaluation de la dysplasie ovarienne : elle détermine le degré de stratification et la perte de polarité (par la mesure de la plus courte distance entre le noyau et la membrane basale, la densité cellulaire), et, le pléiomorphisme nucléaire (par la mesure du périmètre et de la surface nucléaire). Le couplage informatique permet d'obtenir une analyse objective.

Deligdish [142] a ainsi comparé trois groupes : 13 cancers de l'ovaire, 13 transitions entre l'épithélium d'allure bénigne et les zones malignes au sein du groupe précédent, et 8 témoins. L'analyse morphométrique retrouve des différences significatives entre les trois groupes. Son étude conclut cependant à l'importance de l'analyse histopathologique première : en effet, la morphométrie n'est pas complètement objective car elle repose tout d'abord sur l'évaluation histopathologique première, et, deuxièmement, elle ne permet pas pour l'instant de mieux évaluer la dysplasie.

### **1-2/ La dysplasie tubaire :**

Il n'existe pas de définition précise et validée des anomalies constitutives, ce qui impose de les déterminer et d'autre part de les comparer avec un groupe témoin sans facteur de risque cancéreux.

C'est pourquoi, en nous basant sur les données de la littérature, et sur le même principe que le score de dysplasie ovarienne, nous avons établi une échelle d'évaluation morphologique semi-quantitative avec sept anomalies cytologiques ou architecturales (qui ne sont aucunement pathologiques prises individuellement) et deux niveaux de sévérité [133-135] :

- Pseudostratification épithéliale
- Présence de touffes
- Augmentation de la densité nucléaire
- Présence d'atypies nucléaires
- Dédifférenciation
- Augmentation de la taille nucléaire
- Perte de la ciliation

Les résultats vont dans le même sens que pour les ovaires, à savoir un score significatif pour le groupe salpingectomie prophylactique et une gradation entre mutation BRCA et Antécédents familiaux sans mutation BRCA. Ce score est en cours de validation.

Le Tamoxifène (modulateur sélectif des récepteurs aux oestrogènes SERM) est classiquement utilisé comme hormonothérapie dans le traitement adjuvant des cancers du sein mais peut aussi être utilisé comme inducteur de l'ovulation de par son effet « clomid-like » [144]. Les effets endométriaux néfastes du TAM à type de cancers de l'endomètre sont maintenant bien connus et plusieurs observations rapportent des cancers ovariens sous Tamoxifène. Nos

resultats retrouvent des anomalies morphologiques dysplasiques tubaires associées à la prise de TAM. Certes, le lien de causalité est difficile à établir puisque ces patientes avaient toutes un cancer du sein dont cette hormonothérapie clôturait le traitement. Pour autant, toutes les annexectomies ont eu lieu après au moins 4 années d'exposition au TAM; aucune patiente n'était porteuse d'une mutation BRCA 1 ou 2 et aucune n'avait d'autres cancers épidémiologiquement liés. La littérature ne rapporte que peu de cas de dysplasie après exposition au TAM [145-148]. A la lumière de ces résultats, on pourrait évoquer la conjonction d'effet systémique oestrogénique (comme cela est le cas au niveau endometrial) à l'effet clomid like dans la genèse de la dysplasie. Nous prévoyons de comparer les profils morphologiques et immunohistochimiques entre dysplasie sous TAM et dysplasie sous Clomid.

## **2/ Analyse immunohistochimique**

Les deux marqueurs immunohistochimiques p53 et Ki67 sont décrits comme étant significativement exprimés dans les tissus cancéreux ovariens par rapport aux témoins. L'hypothèse que ces marqueurs soient exprimés dans les tissus dysplasiques pourrait ainsi confirmer le caractère pré-invasif. D'autre part, l'expression immunohistochimique différentielle entre trompe et ovaire pourrait aider à savoir qui de la trompe ou de l'ovaire est le plus impliqué dans ces états précoces. Schlosshauer *et al* [136] a trouvé une gradation croissante de ces deux marqueurs en comparant épithélium ovarien normal (faible expression), épithélium dysplasique (forte expression) et cancer de l'ovaire (expression encore plus forte), ce qui serait un argument moléculaire pour avérer l'existence de dysplasie. En ce qui concerne la dysplasie tubaire, Piek *et al* [135] retrouve une expression marquée de ces deux marqueurs au niveau des trompes dysplasiques. Dans une autre étude sur les pièces d'ovariectomies prophylactiques, ses conclusions sont plus nuancées puisque l'expression de Ki 67 était faible, sans expression de p53: Piek *et al* conclut ainsi que les modifications pré-cancéreuses peuvent être absentes des pièces d'ovariectomie prophylactiques pour risque génétique [135].

A notre connaissance, notre étude est la première à proposer une évaluation comparative immunohistochimique des ovaires et des trompes à risque génétique: l'expression de Ki67 et p53 est faiblement présente au niveau des tissus ovariens dysplasiques alors qu'elle est plus marquée au niveau tubaire rejoignant la théorie de la signature moléculaire p53 de Crum *et al* [83]. Ceci pourrait suggérer une atteinte tubaire plus sévère et souligner l'implication de la trompe dans ces premiers états de la carcinogenèse ovarienne.

L'expression majorée de Bcl2 au niveau ovarien et tubaire du groupe dysplasique constituerait également un argument supplémentaire pour le caractère pré-invasif de la dysplasie: Bcl2 est une protéine inhibitrice de l'apoptose et pourrait indiquer un changement vers un phénotype sécrétoire, comme cela est souligné par la perte complète des cellules ciliées. La sur-expression de Bcl-2 dans la dysplasie tubo-ovarienne pourrait conduire à un avantage de croissance cellulaire comme l'a expliqué Piek *et al* [135] .

PAX2 est impliqué dans la différenciation du tractus uro-génital et est exprimé au niveau du tissu Müllérien non cancéreux (endomètre, épithélium tubaire et muqueuse endocervicale) [124-128]. Par contre son expression est faible au niveau des carcinomes séreux de haut grade (71%) et complètement éteinte au niveau des cancers de l'endomètre et des lésions précurseurs endométriaux (77%). Il a récemment été étudié au niveau des SCOUTs, des STICs et cancers ovariens séreux de haut grade où son expression serait faible à nulle [114]. Il semble donc intéressant d'étudier ce marqueur au niveau des cellules dysplasiques. Les premiers cas réalisés retrouvent un marquage nucléaire faible au niveau tubaire et nul au niveau ovarien (sauf au niveau des kystes d'inclusion) qui devra être confirmé sur une plus large série. Précisons que les tests que nous avons effectués sur les STICs montrent un marquage nucléaire faible à nul. La place de PAX2 dans la dysplasie reste donc à préciser.

Enfin, l'originalité de notre étude tient à l'évaluation du marqueur de différenciation précoce de cellules souches ALDH1 (Aldéhyde Déshydrogénase 1). Le modèle de cancérogenèse à partir des cellules souches repose sur le principe d'auto-renouvellement de ces cellules puis de différenciation en progéniteurs multipotents et enfin de synthèse vers des cellules cancéreuses différenciées. Cette population de cellules souches cancéreuses, représentant probablement moins de 5% de la totalité des cellules tumorales, serait responsable de l'agressivité de la maladie, du potentiel métastatique et de la chimio-résistance [148].

La régulation des cellules souches non cancéreuses répond à une balance complexe entre prolifération cellulaire, différenciation cellulaire et mort cellulaire via différentes voies de signalisation (Sonic Hedgehog Shh, Notch ou encore Wnt). Or la dérégulation de ces voies de signalisation associée à certaines mutations pourrait aboutir à la carcinogenèse par l'apparition de cellules souches et progéniteurs cancéreux. Ces mutations sont d'ailleurs l'une des altérations majeures qui pourraient expliquer les différents types histologiques de cancers de l'ovaire. Ainsi, à partir de cellules souches et de progéniteurs cancéreux, les mutations p53 et BRCA aboutiraient aux tumeurs séreuses;  $\beta$ cathénine et PTEN aux tumeurs



endométrioides; p53 aux tumeurs mucineuses et probablement aussi aux tumeurs à cellules claires [149].

La relation BRCA1 et cancer du sein a été particulièrement étudié et il a été démontré à partir de travaux expérimentaux et in vitro que BRCA1 serait un régulateur des cellules souches et progéniteurs mammaires en permettant leur différenciation en cellules luminales et myoépithéliales matures [150, 151].

Différents marqueurs des cellules souches du cancer ovarien ont été décrits : CD44, CD117, CD133 et ALDH1. Les Antigènes de surface cellulaire CD 44, CD117 et CD133 seraient moins spécifiques qu'ALDH1 car potentiellement présents au niveau des progéniteurs cancéreux [149]. ALDH1 est une enzyme qui intervient dans le métabolisme des acides rétinoïques en jouant un rôle probablement central dans la différenciation cellulaire. Le système des acides rétinoïques intervient dans la stabilité chromosomique, la régulation épigénétique et serait probablement un mécanisme protecteur contre les altérations des cellules souches liées au stress oxydatif [152]. Il intervient aussi dans la modulation de différentes voies de signalisation (AKT/ $\beta$ -cathénine, WNT, p21/p53...) elles-même impliquées dans la régulation moléculaire des cellules souches cancéreuses. Des mutations de BRCA1 (LOH...) conduiraient à une surexpression d'ALDH1 au niveau des cellules mammaires et empêcheraient la différenciation de ces cellules souches [151]. Comme BRCA1 intervient aussi dans la réparation de l'ADN et la stabilité génomique, il a été ainsi proposé que les mutations BRCA entraînaient l'accumulation de cellules souches mammaires génétiquement instables, préluces aux cancers du sein [153, 154]; Tous ces éléments nous ont ainsi donné l'idée d'étudier ALDH1 au niveau des pièces d'annexectomie prophylactique et des tissus dysplasiques.

Son comportement étant très original en fonction du type de tissu (epithelium/stroma) et du type cellulaire d'une part [155], nous avons préféré réaliser une analyse descriptive complète: l'expression d'ALDH1 apparaît fortement marquée et semble très spécifique des tissus dysplasiques ovariens et tubaires. Effectivement, au sein même du tissu à risque (ovaire ou trompe), ALDH1 est significativement détecté au niveau des cellules épithéliales dysplasiques alors même que les cellules épithéliales morphologiquement non dysplasiques adjacentes sont négatives. Nous retrouvons des résultats similaires sur une série d'annexectomie soumise à du Tamoxifene, ce qui voudrait dire que des voies de signalisation autres que BRCA sont impliquées.

La signification clinico-pathologique d'ALDH1 reste inconnue dans le cancer de l'ovaire. L'expression d'ALDH1 a été récemment analysée sur une série de 442 cancers ovariens [156]. Contrairement aux cancers du sein où ALDH1 est associé à des stades avancés de mauvais pronostic [154, 157], il serait un facteur de bon pronostic en raison d'une association significative entre forte expression d'ALDH1 et états précoces de cancers de l'ovaire ( $p=0.006$ ) [156]. Deng *et al* [158] a reporté des profils d'expression différents en fonction du type d'organe: contrairement aux résultats de Chang, Deng *et al* constate que'ALDH1 serait surexprimé dans des stades avancés de cancers ovariens ( $p=0.0036$ ). Dans nos travaux, l'expression d'ALDH1 était constamment basse dans les 3 cancers occultes intra-épithéliaux. Même si ces données paraissent contradictoires, la fonction d'ALDH1 pourrait être spécifique et variable entre le type histopathologique de tumeur et le stade ou grade: il est d'ailleurs admis que le comportement moléculaire des cancers de l'ovaire est hétérogène et variable selon le type histologique et le stade, ce que pourrait refléter le marqueur ALDH1. Kryczek *et al* retrouve une expression variable d'ALDH1, atténuée sur des cultures cellulaires cancéreuses ovariennes et augmentée in vivo, suggérant un système de régulation au sein du microenvironnement tumoral (le concept du « stem cell niche » où interviennent différentes voies de signalisation moléculaire via les cytokines IL-6 et IL-8 en particulier) [159]. Ce marqueur semble intéressant dans le difficile diagnostic de dysplasie tubo-ovarienne et pourrait être une clé dans la compréhension des états précoces de la carcinogenèse ovarienne.

### **3/ Analyse moléculaire**

La première technique moléculaire que nous avons utilisée est l'Hybridation Génomique Comparative (CGH sur puce ou CGH array) permettant une analyse pan-génomique [160, 161]. Cette technique repose sur le principe d'hybridation compétitive entre deux fragments d'ADN [162, 163]. Historiquement, la CGH était réalisée en métaphase: il s'agissait de cohybrider l'ADN malade et l'ADN témoin marqués par des fluorochromes différents sur une cible connue en métaphase. Le rapport d'intensité entre les deux fluorochromes permet de déterminer les réarrangements en terme de nombre de copies entre le malade et le témoin. Cette technique souffre d'une relative faible résolution (5-10 Mb). C'est pourquoi la CGH array a été développée. Le principe est identique, c'est-à-dire co-hybrider l'ADN malade avec l'ADN témoin marqués par des fluorochromes différents, mais cette fois-ci sur une puce contenant des fragments connus d'ADN génomiques (chromosomes artificiels de bactéries BAC ou chromosomes artificiels de phages PAC ou oligonucléotides). Les avantages sont représentés par un gain non négligeable dans la résolution (1Mb à quelques kB) permettant de mettre en évidence des réarrangements de très faible taille. L'interprétation des résultats est double, diminuant ainsi les biais d'interprétation: bio-informatique et lecture visuelle par l'opérateur. Les résultats sont finalement vérifiés à l'aide de bases de données (UCSC Genome Browser qui est une base de donnée pour le génome entier et Database of Genomic Variants, Toronto, Canada qui est une base de données de polymorphismes).

A notre connaissance, il s'agit de la première étude de CGH array sur les dysplasies tubo-ovariennes. La CGH array offre ainsi un typage génomique des dysplasies en permettant d'identifier des gènes candidats mais aussi des voies de signalisation impliquées dans la pathogénie. La description moléculaire des formes précoces pré-invasives est rendue délicate du fait de l'hétérogénéité individuelle potentielle et de l'instabilité génétique inhérente (les anomalies détectées sont-elles réellement significatives des états précoces ou bien liées à l'instabilité génétique).

Dans les cancers de l'ovaire sporadique, les réarrangements les plus fréquents sont trouvés au niveau des régions 1q, 2p, 2q, 3q, 6q, 7q, 8q, 12p, 17q, 18q, 20q, ch X à type de gains et au niveau du ch4, en 6q, 8p, 13q, 16q, 18q, Xq à type de pertes [164]. Il a même été démontré que ces profils étaient distincts entre cancers de l'ovaire sporadique et cancers de l'ovaire héréditaire par mutation BRCA [165-169] : les déséquilibres génomiques seraient plus

nombreux en cas de risque génétique, probablement parce qu'il y a moins de réparation de l'ADN (l'une des fonctions de BRCA) et donc une plus grande fragilité du génome.

Ainsi, dans les cancers de l'ovaire héréditaires liés aux mutations BRCA, de très fréquentes amplifications des chromosomes en 1q, 2q, 3q, et 8q ainsi que des délétions en 9q et au niveau du chromosome 19 ont été fréquemment trouvées [167, 168]. La CGH permettrait ainsi d'établir des profils moléculaires spécifiques.

Pourtant, il n'existe pas de telles données concernant les dysplasies tubo-ovariennes: nous avons fait l'hypothèse que la CGH pourrait cibler des régions et identifier des gènes impliqués dans les étapes précoces de cancérogenèse ovarienne. Effectivement, les cancers ont toujours des réarrangements génomiques importants en taille mais aussi en nombre. Pour autant, ces réarrangements secondaires - probablement responsables de la poursuite de la prolifération, du risque métastatique - n'ont pas forcément de lien direct avec la pathogénie et la tumorigenèse. A l'inverse, les remaniements précoces des lésions pré-cancéreuses sont probablement des étapes clés dans ces premiers temps de la cancérogenèse et les gènes candidats correspondants pourraient intervenir directement dans l'initiation tumorale et constituer des cibles diagnostiques et/ou thérapeutiques. Par exemple, Garnis *et al* [170] a montré des remaniements au niveau du bras court du chromosome 1 de lésions pré-cancéreuses pulmonaires intéressant le gène WNT4. Ce gène étant impliqué d'une part dans les voies de signalisation WNT et Notch mais aussi dans les cancers pulmonaires, les auteurs ont fait l'hypothèse d'une dysrégulation des cellules souches comme origine du cancer pulmonaire. Dans notre série, nous retrouvons différentes régions correspondant à des gènes impliqués dans le système de réparation de l'ADN ou la carcinogenèse ou encore des voies de régulation du cycle cellulaire (NET 56 en 17p13.1, ARIH2 en 3p21, hLMB1 en 12p13.31, MIM135A2 en 12q23.1, RAG1, RAG2, C11orf74 en 11p12, Mus Myt1 en 2q25.3, DOK5 en 20q13.2, NFATC1 en 18q23, Bos BRAT1 en 7p22.3-p22.2, RPTOR en 17q25.3, HDAC10 en 22q13.33, PTHLH en 12p11.23, TIMP2 et C1qTNF1 (Tumor necrosis factor) en 17q25.3, ING4 (impliqué dans la voie de signalisation p53) en 12p13.31). Enfin, certains gènes interagissent avec le système des acides rétinoïques, ce qui pourrait faire le lien avec les cellules souches et ALDH1 : ITGB3BP (co-activateur des récepteurs nucléaires rétinoïques) en 1p31.3, NCOR2 (co-répresseur des acides rétinoïques) en 12q24.31.

La littérature [166, 167, 169] souligne également l'importance du bras long du chromosome 11 porteur de plusieurs gènes codant pour des protéines de réparation de l'ADN (comme par exemple YH2AX que nous décrivons dans la partie « perspectives ») : nous retrouvons

effectivement des délétions en 11q. La prochaine étape consistera au screening et à l'identification des gènes correspondant aux régions révélées en CGH array [171].

Si les cellules dysplasiques ovariennes et tubaires partageaient des altérations moléculaires communes, cela pourrait correspondre à une véritable signature moléculaire de la dysplasie. Nos résultats ne retrouvent malheureusement pas de régions communes à tous les cas de dysplasie. Ceci peut s'expliquer d'une part par le faible effectif étudié, mais aussi du fait que les mutations BRCA1 ne sont pas toutes identiques dans notre série. En outre, la variabilité en terme de pénétrance, de phénotypes cliniques distincts au sein d'une même famille et d'une même mutation pourrait suggérer l'existence de gènes de susceptibilité tumorale différents selon les individus. Néanmoins, certaines régions semblent récurrentes sur certains cas de dysplasies tubaires ( Les régions *14q32.2-q32.33* et *20q13.2* contiennent respectivement DOK5 qui est un facteur de transduction cellulaire et TRAF3 qui interagit avec TNF) et ceci devra être confirmé sur une plus large série.

Suite à l'augmentation de résolution, de nombreux réarrangements chromosomiques (pouvant atteindre 5 à 8 Mb) communs à la population générale et sans valeur pathologique ont été mis en évidence. Ces CNV (Copy Number Variations) sont des polymorphismes retrouvés chez plusieurs individus. Les polymorphismes retrouvés dans notre étude amènent plusieurs hypothèses : s'agit-il de CNV constitutionnels ou acquis ? la recherche de ces polymorphismes à partir d'un ADN du même individu mais ne provenant pas des annexes (en pratique échantillon sanguin) pourrait orienter (ces CGH array seront prochainement réalisés dans notre département). S'ils n'ont pas de signification pathologique, l'apparition de novo de taille supérieure à 1 Mb ne pourrait-elle pas malgré tout être associées à une susceptibilité particulière, voire une caractéristique de la pathologie dysplasique [172] ? De plus larges cohortes sont nécessaires pour répondre à cette question.

Un autre point intéressant est la mise en évidence de régions remaniées de grande taille supérieure à 300 Kb, ce qui est d'ailleurs un argument supplémentaire démontrant que la dysplasie n'est pas une variante de la normale. Comme ces remaniements sont inférieurs en taille à ceux que l'on peut trouver en cas de cancers, la dysplasie serait ainsi bel et bien une étape préalable au cancer. En outre, comme certains de ces réarrangements sont communs avec les cas de cancers étudiés en CGH, ce pourrait être l'argument d'un continuum lésionnel entre ces deux entités. Reste la question de savoir si ces réarrangements sont en relation avec

l'instabilité génétique ou bien des premières anomalies spécifiques des états pré-cancéreux qui persisteraient au stade invasif.

Quoiqu'il en soit l'instabilité génomique (cf infra) est l'une des principales caractéristiques des cancers et conduit entre autre à des anomalies génomiques en terme de nombre de copies : nos résultats moléculaires en CGH constituent donc une première preuve de l'existence de cette instabilité au sein des dysplasies tubo-ovariennes

## **Perspective(s): Le concept d'instabilité génomique**

### **1/ apport des télomères et télomérases [173-176].**

L'instabilité génomique est probablement l'une des premières étapes de la cancérogenèse favorisant ainsi l'accumulation de nombreuses mutations. La première description d'instabilité concernait la mise en évidence d'instabilité des microsatellites. A l'échelon moléculaire, cette instabilité pouvait conduire à des réarrangements chromosomiques, des anomalies de duplication ou encore de ségrégation pendant la mitose, des dysfonctions dans les systèmes de réparation de l'ADN. BRCA1 et BRCA2 agissent notamment dans la réparation double brin de l'ADN. Deux voies interviennent dans cette réparation double brin : la recombinaison homologue (HR) et la réparation par jonction des terminaisons non-homologues (NHEJ ou Non Homologous End Joining). La recombinaison homologue fait appel à l'utilisation de la chromatide sœur lors des phases S et G2 du cycle cellulaire, et est activée via BRCA1. BRCA2 agirait plutôt indirectement dans cette voie en régulant l'activité de RAD51. Les mutations BRCA entraînent ainsi une dysfonction de ce système et l'apparition d'une instabilité génomique.

Les résultats en terme de réarrangements chromosomiques révélés en CGH array dans nos travaux sont une première approche de l'instabilité génomique présente dans les dysplasies tubo-ovariennes. Les implications cliniques seraient fondamentales en permettant de classer les dysplasies en fonction de leur signature moléculaire et pourquoi pas d'en déduire leur pronostic évolutif. Au niveau thérapeutique, on peut citer l'importance des thérapeutiques ciblées dans le cancer du sein en cas d'amplification de Her2neu. Pour le sein et l'ovaire à risque génétique, les anti-PARP (poly ADP-ribose polymerases) semblent prometteurs également puisque les PARP interagissent au niveau des voies de réparation de l'ADN et plus spécifiquement sur la voie de la recombinaison homologue.

Plus récemment, les dysfonctions télomériques ont été décrites comme une des premières phases d'instabilité génomique et constituent ainsi notre seconde approche moléculaire. Les télomères sont situés à l'extrémité des chromosomes et sont constitués d'une multitude de répétition de l'hexamère 5'-TTAGGG-3'. Leur fonction principale est d'assurer la stabilité chromosomique. Les télomères sont régulièrement raccourcis durant la division cellulaire. Un raccourcissement trop important (« telomere crisis ») conduit à une instabilité chromosomique, l'activation des systèmes de réparation de l'ADN, puis à la mort cellulaire. Au niveau tumoral, les télomères sont habituellement raccourcis, rendant la cellule instable, sans atteindre la taille critique synonyme de mort cellulaire, grâce à l'activité télomérase

(généralement limitée aux cellules souches, progéniteurs et aux cellules tumorales, mais absents des cellules somatiques normales). Les cellules génétiquement instables peuvent alors continuer à proliférer. Récemment, Kuhn *et al* [176] a évalué par FISH la taille télomérique d'une série de 22 STICs par rapport à des témoins non cancéreux et des cancers de haut grade : 82% des STICs ont les télomères les plus courts, suivis des cancers, et enfin les témoins sains ont les télomères les plus longs. Les auteurs concluent au fait que les STICs sont probablement l'une des premières étapes dans la cancérogenèse tubo-ovarienne. Nous avons eu l'idée d'étudier ces télomères sur nos cas de dysplasie afin de confirmer s'il s'agit bien de lésions pré-invasives encore plus précoces.

### **Matériel & Méthode :**

Groupe E : 51 cas de dysplasies (20 dysplasies ovariennes et 31 dysplasies tubaires), provenant de 36 annexectomies prophylactiques porteuses de la mutation BRCA1 et de 15 annexectomies prophylactiques porteuses de la mutation BRCA2.

Groupe F : 36 témoins non cancéreux (12 ovaires et 24 trompes)

Groupe G : 12 STICS (9 STICs proviennent de la série de M.Devouassoux et E.Watkin)

Groupe H : 43 cancers tubo-ovariens dont 16 cancers d'origine tubaire et 27 cancers d'origine ovarienne

Tous ces cas ont été microdisséqués sur coupe en paraffine selon le même protocole décrit précédemment. Une étape d'extraction de l'ADN puis de purification ont été ensuite réalisées. Il n'y a pas eu d'étape supplémentaire d'amplification pour éviter un biais de mesure probable.

Enfin, la longueur télomérique a été évaluée par PCR quantitative en temps réel d'après la technique de Cawthon [177]: il s'agit de déterminer le rapport entre le nombre de copies de répétition télomérique et le nombre de copies de répétition d'un gène unique d'un échantillon et d'un ADN de référence. Le gène de ménage utilisé est *gapdh*.



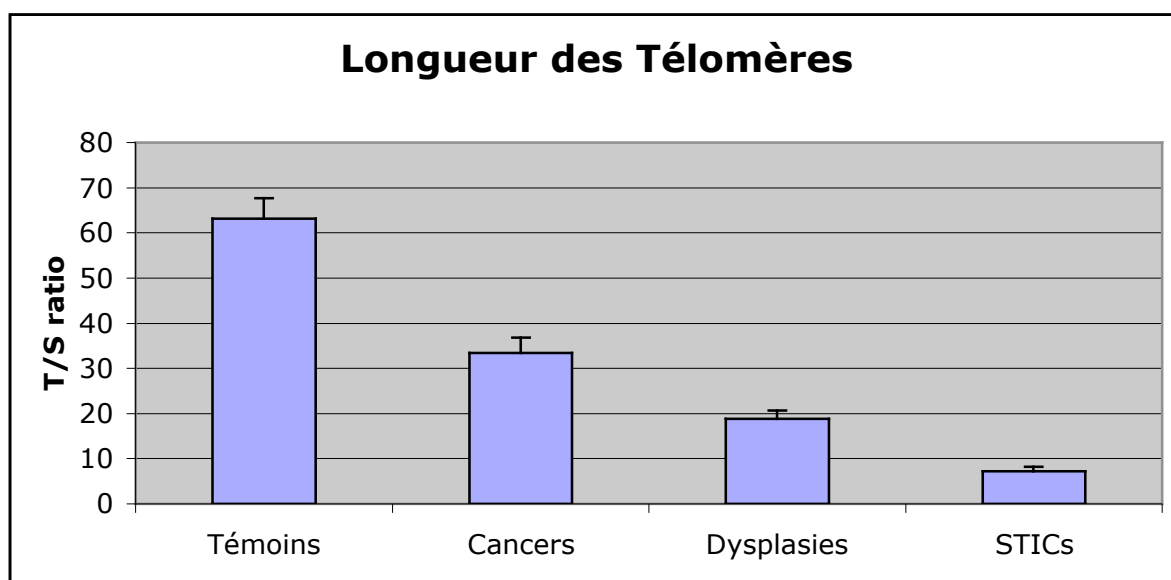
## Résultats : (cf tableau 18, graphiques 3 et 4)

Le ratio T/S obtenu pour chaque échantillon est le reflet de la longueur relative des télomères.

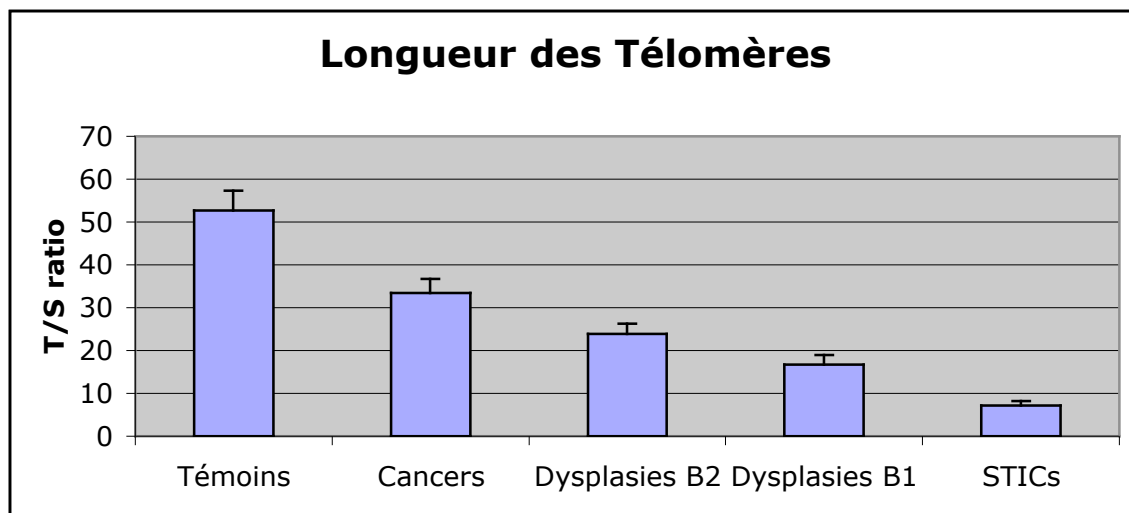
	Ratio T/S	SEM ( $\delta/\sqrt{n}$ )	p (par rapport aux témoins)
Témoins (n=36)	52.75	4.62	
• témoins ovaire (n=12)	56.76	2.77	
• témoins trompes (n=24)	50.74	4.25	
Dysplasies (n=51)	18.78	1.85	<0.007
• dysplasie ovarienne (n=20)	19.41	3.02	
• dysplasie tubaire (n=31)	18.37	2.33	
Cancers (n=43)	33.46	3.31	<0.01
• cancer ovarien (n=27)	31.38	2.9	
• cancer tubaire (n=16)	36.96	7.33	
STICs (n= 12)	7.23	0.99	<0.000002

Tableau 18: Longueur télomérique relative.

SEM= standard error of mean ;  $\delta$ = écart type ; n= effectif



Graphique 3: les télomères les plus courts concernent les STICs puis les dysplasies.



Graphique 4: au niveau des dysplasies, les télomères sont plus courts en cas de mutations BRCA1 que BRCA2.

**Interprétations (cf figure 6):** les télomères des dysplasies apparaissent raccourcis par rapport aux témoins ( $p < 0.005$ ). On ne retrouve pas de différence significative en fonction du type d'organe (ovaire/trompe) qu'il s'agisse des témoins, des dysplasies ou encore des cancers. Par contre, le statut BRCA modifie de façon significative la longueur télomérique ( $p = 0.0049$ ): 16.65 en cas de mutations BRCA1 et 23.90 en cas de mutations BRCA2, ce qui signifierait que les dysplasies tubo-ovariennes sont d'autant plus instables qu'il y a une mutation de type BRCA1.

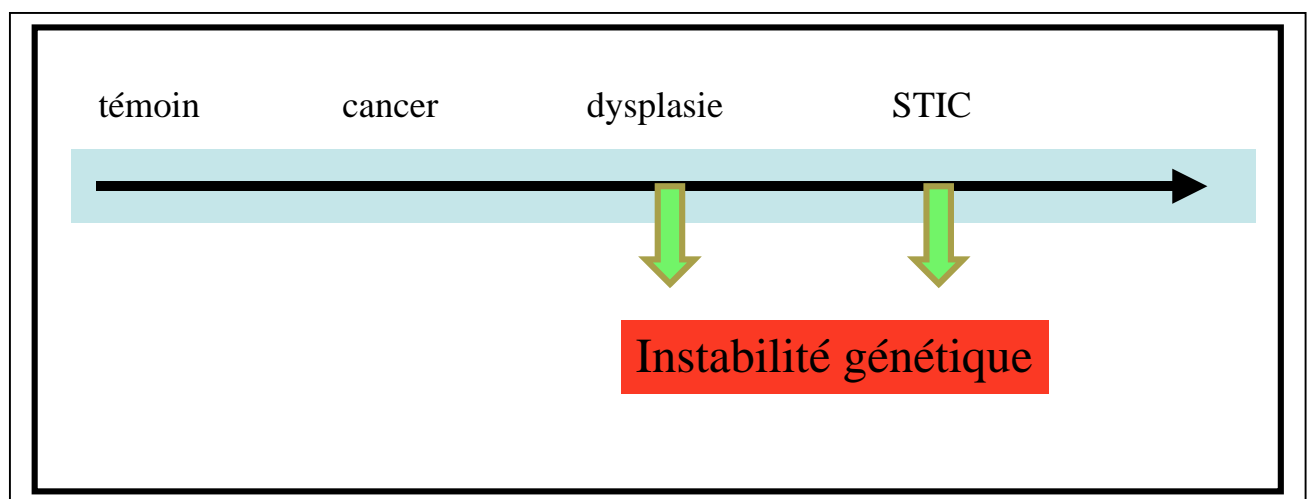


Figure 6 : le concept d'instabilité génétique

Les STICs ont les télomères les plus courts ce qui rejoint les résultats de Kuhn *et al* [176], puis les dysplasies et enfin les cas de cancers. Cela signifie que les lésions précancéreuses (STICs et dysplasie) sont les plus instables génétiquement. Il est effectivement rapporté que les raccourcissements télomériques surviennent précocement pendant la cancérogenèse (dans près de 90% des lésions pré-invasives de la vessie, du col utérin, du colon ou encore de l'œsophage), et s'associent fréquemment avec des réarrangements génomiques (ce qui rejoint nos résultats de CGH) [173]. L'activation des télomérases surviendrait probablement plus tardivement au stade invasif et donc contre-balancerait le raccourcissement télomérique : la stabilisation de longueur télomérique à ce stade représenterait d'ailleurs un avantage en terme de prolifération tumorale et d'échappement à l'apoptose [174].

L'interaction télomères/p53/cellules souches serait d'ailleurs à la base de la cancérogenèse : le raccourcissement télomérique induit l'activation de la voie p53 et conduit au final à l'apoptose. En revanche, en cas de mutation du p53, la dysfonction télomérique (en particulier au niveau des cellules souches et progéniteurs) n'est pas réparée ou signalée et conduit à l'instabilité génomique et son cortège d'aberrations chromosomiques, prélude au cancer. Il serait intéressant également d'étudier l'activité des télomérases (une sous-unité ARN hTERT et une sous-unité protéique catalytique hTR) mais aussi les protéines de l'architecture télomérique (les protéines du complexe « Shelterin » TRF1, TRF2, POT1) au sein des tissus dysplasiques, STICs et cancéreux de haut grade. Les protéines TRF1 et TRF2 ont un rôle de régulation négative de l'élongation télomérique et interagissent avec les télomérases. POT aurait une double activité antagoniste en fonction des conditions cellulaires : régulation positive ou négative de la taille télomérique dépendant de la télomérase [178-180].

L'interconnexion complexe de ces différentes protéines et leur interaction via la télomérase sur la régulation télomérique serait un complément pertinent et nous sommes en train de faire la mise au point (expression des ARN) [181, 182]. Je devrais d'ailleurs exploiter cette voie lors de ma mobilité post-doctorale au Canada. Il n'y a pas d'étude similaire dans la littérature. Il est important de préciser qu'il n'y a pas forcément de corrélation évidente entre longueur des télomères et télomérases [183]. Comme nous l'avons dit, il est probable que les télomérases ne soient pas activées au stade pré-cancéreux. Pour autant, la dynamique télomérique ne se résume pas à longueur des télomères et activation ou non des télomérases. L'homéostasie télomérique est la résultante de protéines régulatrices, de l'expression des télomérases, de régulations épigénétiques, de divers facteurs environnementaux comme le stress oxydatif... [183]

## **2/ apport de $\gamma$ H2AX : [184, 185]**

Les cassures du double brin de l'ADN sont une des atteintes les plus critiques de l'ADN et de la stabilité génomique qui en découle. Une des premières réponses visant à réparer cette cassure est la phosphorylation de l'histone H2AX au niveau de la sérine 139 en  $\gamma$ H2AX qui contribuera à recruter différents facteurs spécifiques de réparation et de signalisation de l'ADN dont p53 et BRCA1. Ce variant isoforme de l'histone H2A joue également un rôle important au cours de l'activation des checkpoints. Les checkpoints correspondent aux états de transition entre deux phases cellulaires qui peuvent être inhibés par des lésions génotoxiques. Il se produit alors un ralentissement voire l'arrêt de la progression d'une phase à la suivante (checkpoint G1/S ou G2/M), ou au cours de la réplication (checkpoint intra-S). La phosphorylation de H2AX entraîne la condensation de la chromatine de part et d'autre de la cassure, ce qui rend  $\gamma$ H2AX détectable au niveau nucléaire en immunohistochimie.

Une forte expression de  $\gamma$ H2AX a été mise en évidence au niveau de la plupart des lésions précancéreuses et a été considérée comme représentant une fonction anti-tumorale. Les études expérimentales ont montré que les souris déficientes pour H2AX étaient plus à risque de déficit immunitaire, de stérilité, ou encore plus sensibles aux radiations ionisantes, tout ceci s'expliquant par une plus grande instabilité chromosomique liée à une diminution des capacités des systèmes de réparation de l'ADN. Quand en plus ces souris étaient knock-outs pour le p53, le risque tumoral était augmenté.

Enfin, les dysfonctions télomériques (en particulier le raccourcissement télomérique) sont étroitement corrélées à une surexpression de  $\gamma$ H2AX .

Tous ces éléments nous ont donné l'idée d'étudier ce marqueur sur nos cas de dysplasie. Les résultats préliminaires de 20 dysplasies tubo-ovariennes porteurs de la mutation BRCA1 retrouvent un score immunoréactif IRS élevé entre 8 et 12 dans plus de 80% des cas aussi bien au niveau de l'épithélium tubaire, de l'épithélium ovarien que de l'épithélium revêtant les kystes d'inclusion. Au niveau des STICs, le marquage nucléaire apparaît fortement et diffusément présent. Ces résultats sont un argument supplémentaire de l'instabilité génomique. L'équipe de Crum a étudié la corrélation de  $\gamma$ H2AX avec la signature p53 au niveau des STICs : dans 66% (20/30 cas) des cas, ils notent une co-localisation  $\gamma$ H2AX /p53 [76]. Si nous confirmons ces résultats pour notre série de STICs, en revanche, ce n'est pas le cas pour les dysplasies où l'expression de p53 est faible à modérée. Il serait intéressant d'étudier ce marqueur sur tous nos cas de dysplasie et en particulier vérifier s'il existe une

expression différentielle entre les mutations BRCA1 et BRCA2 comme nous l'avons montrée avec les télomères.

D'autres voies seraient intéressantes à étudier comme les protéines régulatrices de l'apoptose.

Dans la famille des protéines Bcl2, nous avons déjà étudié Bcl2 : Bcl2 est une protéine inhibitrice de l'apoptose et pourrait indiquer un changement vers un phénotype sécrétoire. La sur-expression de Bcl-2 dans la dysplasie tubo-ovarienne pourrait conduire à un avantage de croissance cellulaire [135] . Bax, une autre protéine de la famille Bcl2 a plutôt une activité pro-apoptotique et agit sur la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire via l'activation de caspases [186].

## Conclusion :

L'ensemble de ce travail offre un profil immunohistochimique et moléculaire précis des dysplasies tubo-ovariennes mais aussi des STICs (cf graphique infra).

La dysplasie tubo-ovarienne apparaît comme étant bel et bien une lésion pré-cancéreuse du cancer tubo-ovarien. Il convient néanmoins de faire la distinction entre dysplasie à risque génétique (prélude aux cancers) de la dysplasie survenant après stimulation de l'ovulation et dont le profil différent laisse présager d'une évolution différente. Des études immunohistochimiques et moléculaires (marqueurs et techniques identiques) sont en cours dans notre département.

Le modèle d'histogenèse proposé par Crum *et al* [187, 188] réconcilie les anciennes théories ovariennes et les récentes théories tubaires :

- Origine ovarienne :
  - à partir de l'épithélium de surface, des kystes d'inclusion et invaginations épithéliales, il y aurait mutation du p53 au sein de lésions dysplasiques associées à de l'instabilité génétique pour finalement aboutir aux carcinomes séreux de haut grade (Type 2).
  - La pathogénie du type 1 consisterait en la séquence cystaédénomes/adénofibromes \_tumeurs borderlines \_cancer associée à différentes mutations de BRAF, K-RAS, PTEN,  $\beta$  caténine.
- Origine tubaire :
  - Les lésions se développent à partir du pavillon tubaire puis s'étend à l'ovaire et péritoine en raison de la proximité anatomique. C'est la séquence signature p53\_dysplasie tubaire\_STIC\_carcinome séreux [187].
  - L'épithélium tubaire non néoplasique s'implante à la surface de l'ovaire, créant des foyers d'endosalpingiose. Il y aurait ensuite mutation du p53 aboutissant alors au cancer séreux de haut grade.

A la lumière de nos résultats morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires, il semblerait que l'on puisse rajouter les lésions dysplasiques tubaires et ovariennes dans ce schéma d'oncogenèse.

Deux éléments importants pourraient avoir une implication clinique prochaine : le marqueur de différenciation précoce de cellules souches ALDH1 et les dysfonctions télomériques.

- ALDH1 et les voies de signalisation qui en découlent pourraient effectivement constituer une cible intéressante dans le dépistage et la prévention précoce.
- La longueur télomérique au niveau sanguin pourrait constituer un marqueur biologique de dysplasie très prometteur, comme cela a déjà été évoqué au niveau rénal, pulmonaire, vésicale ou hématologique (raccourcissement télomérique sanguin correspondant à un risque de cancers en cas de prédisposition) [173, 174].

La poursuite de ces travaux sur de plus larges séries pourra sans aucun doute aider à mieux comprendre la physiopathologie des cancers ovariens et leurs états les plus précoces.

### Dysplasie tubaire :

- Ki 67 +      Bcl2 ++
- P 53 ++      PAX2 +
- ALDH1 +++
- λH2AX ++
- Réarrangements moléculaires subtils
- taille télomères: -

**TROMPE**

### STIC :

- Ki 67 ++      Bcl2 + ou -
- P 53 +++      PAX2 -
- ALDH1 -
- λH2AX +++
- Réarrangements moléculaires
- taille télomères: --

### Dysplasie ovarienne :

- Ki 67 +      Bcl2 ++
- P 53 +      PAX2 -
- ALDH1 +++
- λH2AX ++
- Réarrangements moléculaires subtils
- taille télomères: -

**OVAIRE**

### Cancer intra-épithélial :

- Ki 67 ++      Bcl2 + ou -
- P 53 +++      PAX2 -
- ALDH1 -
- λH2AX +++
- Réarrangements moléculaires
- taille télomères: --



## **Bibliographie :**

- 1/ Dauplat J, Guastalla JP. Cancer de l'ovaire. Paris ; Arnette Blackwell, 1996.
- 2/ Brewer MA, Johnson K, Follen M, Gershenson D, Bast RJ. Prevention of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia. *Clinical Cancer Research*. 2003; 9(1):20-30.
- 3/ Dauplat J, Lefranc JP, Bremond A. Prevention of ovarian cancer by prophylactic ovariectomy. *Chirurgie*. 1998 Sep;123(4):405-8
- 4/ Bignon YJ, Vaurs C, Vidal V. Prédispositions héréditaires aux cancers des ovaires. In *Cancer de l'ovaire*, p63-65. Paris ; Arnette Blackwell, 1996.
- 5/ Ford D, Easton DF, Bishop T, Narod SA, Goldgar DE. Risk of cancer in BRCA 1 mutation carriers. *Lancet* 1994; 343: 692-5.
- 6/ Lynch HT, Bewtra C, Lynch JF. Familial ovarian carcinoma. *Am J Med* 1986; 81: 1073-6.
- 7/ Bewtra C, Watson P, Conway TA, Read-Hippee C, Lynch HT. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. *Int J Gynecol Pathol*, 1992, 11, 180-187.
- 8/ Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Golgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998; 62 (3): 676-89.
- 9/ Ramus SJ, Gayther SA. The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Mol Oncol* 2009 ; 3 : 138-150
- 10/ Jazaeri AA, Yee CJ, Sotiriou C, Brantley KR, Boyd J, Liu ET : Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA-2linked, and sporadic ovarian cancers. *J Natl Cancer Inst* 2002 ; 94 : 990-1000.
- 11 Bishop DT. BRCA1, BRCA2, BRCA3...a myriad of breast cancer genes. *Eur J Cancer*. 1994; 30 (12): 1738-9
- 12/ Bonadona V, Lasset C. Inherited predisposition to breast cancer : after the BRCA1 and BRCA2 genes, what next ? *Bull Cancer*. 2003 ; 90 (7) : 587-94..
- 13/ Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, Bewtra C, Lynch JF, Butts M, Godwin AK. Hereditary ovarian carcinoma : Heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol* 2009 ; 3 : 97-137.
- 14/ National institutes of Health consensus development conference statement. Ovarian cancer : screening, treatment, follow-up. *Gynecol oncol* 1994 ; 55 : 4-14

- 15/ Dauplat J, Lefranc JP, Bremond A. Prevention of ovarian cancer by prophylactic ovariectomy. *Chirurgie*. 1998 Sep;123(4):405-8
- 16/ Folkins AK, Jarboe EA, Roh MH, Crum CP. Precursors to pelvic serous carcinoma and their clinical implications. *Gyn Oncol* 2009 ; 113 : 391-96
- 17/ Merajver SD, Pham TM, Caduff RF et al. Somatic mutation in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumours. *Nat Genet* 1995; 9: 439-43
- 18/ Finch A, Shaw P, Rosen B, Murphy J, Narod SA, Colgan TJ. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gyn Oncol* 2006; 100: 58-64.
- 19/ Zheng W, Lu JJ, Luo F, Hsieh J, Wang CY, Zhang C, Chang L, Cho MM, Stanczyk FZ. Reduction of BRCA1 expression in sporadic ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000 ;76(3):294-300.
- 20/ Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR, Anders KH, Press MF, Clarke K, Karlan B, Scully R, Slamon DJ. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet* 1999 ; 21 (2): 236-40.
- 21/ Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, Karlan BY. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res* 2000; 60 (19): 5329-33
- 22/ Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92 (7): 564-9
- 23/ Hilton JL, Geisler JP, Rathe JA, Hatterman-Zogg MA, De Young B, Buller RE. Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94 (18): 1396-406
- 24/ Bennett LM, McAllister KA, Malphurs J, Ward T, Wiseman RW. Mice heterozygous for a Brca1 or Brca2 mutation display distinct mammary gland and ovarian phenotypes in response to diethylstilbestrol. *Cancer Res*. 2000 1; 60 (13): 3461-9.
- 25/ Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Mishellany F, Dauplat MM, Tardieu AS, Pomel C, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly J, Dechelotte P, Dauplat J. Ovarian epithelial dysplasia: myth or reality? Review. *Gynecol Obstet Fertil*, 2008; 36: 800-807.
- 26/ Fathalla M. Incessant ovulation : a factor in ovarian neoplasia ? *Lancet* 1971; 2: 163.

- 27/ Riman T, Nilsson S, Persson IR. Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 783-95.
- 28/ Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Webb PM, Green AC. Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2003; 104: 228-232.
- 29/ Fredrickson T. Ovarian tumors of the hen. *Environ Health Perspect* 1987; 73: 35-51.
- 30/ Hamilton TC, Godwin AK, Ozols RF. Carcinogénèse ovarienne, in *Cancer de l'ovaire*. Paris ; Arnette Blackwell, 1996 ; p21-38.
- 31/ Bamford PN, Steele SJ. Uterine and ovarian carcinoma in a patient receiving gonadotrophin therapy. Case report. *Br J Obstet Gynaecol*. 1982 ; 89(11):962-4.
- 32/ Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 1184-203.
- 33/ Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE, Self SG. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med* 1994; 331: 771-6.
- 34/ Nieto JJ, Crow J, Sundaresan M, Constantinovici N, Perret CW, Mc Lean AN, Hardiman PJ. Ovarian epithelial dysplasia in relation to ovulation induction and nulliparity. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 344-349.
- 35/ Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Mishellany F, Dauplat MM, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly J, Dechelotte P, Dauplat J. Ovarian epithelial dysplasia after ovulation induction: time and dose effect. *Human Reprod* 2009; 24: 132-138.
- 36/ Dauplat J, Chene G, Pomel C, Dauplat MM, Le Bouedec G, Mishellany F, Lagarde N, Bignon YJ, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly J, Dechelotte P, Penault-Llorca F. Comparison of dysplasia profiles in stimulated ovaries and in those with a genetic risk for ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2009; 45 (17): 2977-83.
- 37/ Mahdavi A, Pejovic T, Nezhat F. Induction of ovulation and ovarian cancer: a critical review of the literature. *Fertil Steril* 2006; 85: 819-26.
- 38/ Schuetz AW, Lessman C. Evidence for follicle wall involvement in ovulation and progesterone production by grog follicles in vitro. *Differentiation*, 1982; 22: 79-84.
- 39/ Colgin DC, Murdoch WJ. Evidence for a role of the ovarian surface epithelium in the ovulatory mechanism of the sheep: secretion of urokinase-type plasminogen activator. *Animal Reproduction Science*, 1997; 47: 197-204.

- 40/ Hall JA, Meisterling EM, Benoit AM, Cooper DA, Coleman DA, Lerner SP, Lewis PE, Dailey RA. Factors contributing to the formation of experimentally induced ovarian cysts in prepubertal gilts. *Domestic Animal Endocrinology*, 1993; 10: 141-155.
- 41/ Osterholzer HO, Johnson JH, Nicosia SV. An autoradiographic study of rabbit ovarian surface epithelium before and after ovulation. *Biol Reprod*. 1985 Oct; 33(3):729-38.
- 42/ Murdoch WJ, McDonnell AC. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction*, 2002; 123: 743-750.
- 43/ Smokovitis A, Kokolis N, Alexaki-Tzivanidou E. The plasminogen activator activity is marked increased mainly at the area of the rupture of the follicular wall at the time of ovulation. *Animal Reproduction Science*, 1988; 16: 285-294.
- 44/ Peng XR, Hsueh AJW, Ny T. Transient and cell-specific expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen-activator –inhibitor type 1 results in controlled and directed proteolysis during gonadotropin-induced ovulation. *European Journal of Biochemistry*, 1993; 214: 147-156.
- 45/ Tsafriri A, Reich R. Plasminogen activators in the preovulatory follicle: role in ovulation. In *Plasminogen Activators: From cloning to therapy*, pp81-93, 1991. Ed. Abbate, Raven Press.
- 46/ Stack MS, Ellerbroek SM, Fishman DA. The role of proteolytic enzymes in the pathology of epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Oncology*, 1998; 12: 569-576.
- 47/ Rabbani SA. Metalloproteinases and urokinase in angiogenesis and tumor progression. In *Vivo*, 1998; 12: 135-142.
- 48/ Kobayashi H, Ohi H, Sugimura M, Shionhara H, Fugjii T, Terao T. Inhibition of in vitro ovarian cancer cell invasion by modulation of urokinase-type plasminogen activator and cathepsin B. *Cancer research*, 1992; 52: 3610-3614.
- 49/ Wilhelm O, Schmitt M, Hohl S, Senekowitsch R, Graeff H. Antisense inhibition of urokinase reduces spread of human ovarian cancer in mice. *Clinical and Experimental metastases*, 1995; 13: 296-302.
- 50/ Auersperg N, Ota T, Mitchell GWE. Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12: 691-703.
- 51/ Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG, Kruk PA. Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells : phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab Invest* 1994; 71: 510-8.

- 52/ Dyck HG, Hamilton TC, Godwin AK, Lynch HT, Maines-Bandiera SL, Auersperg N. Autonomy of the epithelial phenotype in human ovarian surface epithelium: changes with neoplastic progression and with a family history of ovarian cancer. *Int J Cancer* 1996; 69: 429-36.
- 53/ Huntsman D, Reseau JH, Klineberg E, Auersperg N. Comparison of c-met expression in ovarian epithelial tumors and normal epithelia of the female reproductive tract by quantitative laser scan microscopy. *Am J Pathol* 1999; 155: 343-8.
- 54/ Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 2001; 38: 87-95.
- 55/ Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1983;71(4):717-21.
- 56/ Choi KC, Kang KC, Tai CG. Follicle-stimulating hormone activates mitogene-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2245-53
- 57/ Choi JH, Choi KC, Auersperg N. Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor activates oncogenic pathways in preneoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5508-16
- 58/ Schiffenbauer YS, Abramovitch R, Meir G. Loss of ovarian function promotes angiogenesis in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 13203-08
- 59/ Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Russell P, Hacker NF, Ward BG, Quinn MA, Green AC. Hormone replacement therapy and risk of epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 1999 ;81(3):559-63.
- 60/ Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Lewis JL, ,Strom BL, Harlap S, Shapiro S. A case-control study of oral contraceptive use and invasive epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol.* 1994; 139(7):654-61.
- 61/ Rish HA. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 1774-86.
- 62/ Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Lewis JL, ,Strom BL, Harlap S, Shapiro S. A case-control study of oral contraceptive use and invasive epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol.* 1994; 139(7):654-61.
- 63/ Clinton GM, Hua W. Estrogen action in human ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997; 25: 1-9.
- 64/ Garg PP, Kerlikowske K, Subak L, Grady D. Hormon replacement therapy and the risk of epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 472-9.

- 65/ Green A, Purdie D, Bain C, Siskind V, Russell P, Quinn M, Ward B. Tubal sterilisation, hysterectomy and decreased risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* 1997; 71: 948-951.
- 66/ Cramer DW, Liberman RF, Ernstoff LT, Welch WR, Greenberg R, Harlow BL. Genital talc exposure and risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* 1999; 81: 351-356.
- 67/ Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 162-3
- 68/ Hardiman P, Nieto JJ, McLean AB. Infertility and ovarian cancer. Editorial. *Gyn Oncol* 2000; 76: 1-2.
- 69/ Wan TS, Chan LC, Ngan HY, Tsao SW. High frequency of telomeric associations in human ovarian surface epithelial cells transformed by HPV oncogenes. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 95 (2): 166-172.
- 70/ Lai CH, Wang CY, Lin CY, Pao CC. Detection of HPV RNA in ovarian and endometrial carcinomas by reverse transcription polymerase chain reaction. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 38 (4): 276-280.
- 71/ Savelieva E, Belair CD, Newton MA, Devries S, Gray JW, Waldman F, Reznikoff CA: 20q gain associates with immortalization; 20q 13.2 amplification correlates with genome instability in HPV 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene* 1997; 14 (5): 551-560.
- 72/ Altinoz MA, Korkmaz R. NF-kappaB, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen and NSAID prevention of the ovarian cancer. *Neoplasia* 2004, 51: 239-47
- 73/ Fleming JS, Beaufie CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Molecular and cellular endocrinology*, 2006; 247: 4-21.
- 74/ Resta L, Russo S, Colucci GA, Prat J. Morphologic precursors of ovarian epithelial tumors. *Obstet Gynecol* 1993; 82: 181-6.
- 75/ Berchuck A, Kohler MF, Boente MP, Rodriguez GC, Whitaker RS, Bast RC. Growth regulation and transformation of ovarian epithelium. *Cancer* 1993; 71: 545-51.
- 76/ Folkins AK, Jarboe EA, Saleemuddin A, Lee Y, Callahan MJ, Drapkin R, Garber JE, Muto MG, Tworoger S, Crum CP. A candidate precursor to pelvic serous cancer (p53 signature) and its prevalence in ovaries and fallopian tubes from women with BRCA mutations. *Gynecol oncol* 2008; 109: 168-73
- 77/ Kindelberger D, Lee Y, Hirsch MS, Feltmate D, Medeiros F, Callahan MJ, Garner EO, Gordon RW, Birch C, Berkowitz RS, Muto MG, Crum CP. Intraepithelial carcinoma of the

fimbria and pelvic serous carcinoma: evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 161-9

78/ Powell CB, Kenley E, Chen LM, Crawford B, McLennan J, Zaloudek C, Komaromy M, Beattie M, Ziegler J. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA mutation carriers : role of serial sectioning in the detection of occult malignancy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 127-32

79/ Finch A, Shaw P, Rosen B, Murphy J, Narod SA, Colgan TJ. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 58-64

80/ Callahan MJ, Crum CP, Medeiros F, Kindelberger DW, Elvin JA, Garber JE, Feltmate CM, Berkowitz RS, Muto MG. Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *J Clin oncol.* 2007; 25: 3985-90

81/ Leeper K, Garcia R, Swisher E, Goff B, Greer B, Paley P. Pathologic findings in prophylactic oophorectomy specimens in high-risk women. *Gynecol oncol* 2002; 87: 52-6

82/ Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, Garber JE, Cramer DW, Crum CP. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 230-6

83/ Crum CP. Intercepting pelvic cancer in the distal fallopian tube : Theories and realities. *Mol Oncol* 2009 ; 3 : 165-70

84/ Vaurs-Barriere C, Penault-Llorca F. Molecular abnormalities in epithelial ovarian tumors: present and future. *Bull Cancer* 2001; 88: 741-51

85/ Landen CN, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 995-1005

86/ Kurman RJ, Ming-Shih I. Pathogenesis of ovarian cancer. Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27 (2): 151-60

87/ Ming-Shih I, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis. A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164: 1511-18

88/ Han L, Landen C, Trevino J. Anti-angiogenic and anti-tumor effects of SRC inhibition in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 8633-39

89/ Ishizawar R, Parsons SJ. C-SRC and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 2004; 6: 209-14

90/ Silva CM. Role of STATs as downstream signal transducers in SRC family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 2004; 23: 8017-23

91/ Leary JA, Edwards BG, Houghton CR. Amplification of HER 2/neu oncogene in human ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1992; 2: 291-4

- 92/ Sui L, Dong Y, Ohno M. Implication of malignancy and prognosis of p27, Cyclin E and Cdk2 expression in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 56-63
- 93/ Dhar KK, Branigan K, Parkes J. Expression and subcellular localization of cyclin D1 protein in epithelial ovarian tumour cells. *Br J Cancer* 1999; 81: 1174-81
- 94/ Barrette BA, Srivatsa PJ, Cliby WA. Overexpression of p34cdc2 protein kinase in epithelial ovarian carcinoma. *Mayo clinic Proc* 1997; 72: 925-29
- 95/ Bao R, Connolly DC, Murphy R. Activation of cancer-specific gene expression by the surviving promoter. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 522-28
- 96/ Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 65-71
- 97/ Frumovitz M, Sood A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway as a therapeutic target in gynaecologic malignancies. *Gynecol oncol* 2007; 104: 768-78.
- 98/ Schuyer M, Berns EMJJ. Is TP53 dysfunction required for BRCA1-associated carcinogenesis ? *Mol Cell Endoc* 1999 ; 155 : 143-52
- 99/ Wu LC, Wang ZW, Tsan JT. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet* 1996 ; 14 : 430-40
- 100/ Buller RE, Lallas TA, Shahin MS, Sood AK, Hatterman-Zogg M, Anderson B, Sorosky JI, Kirby PA. The p53 mutational spectrum associated with BRCA1 mutant ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001 ; 7 : 831-38
- 101/ Brugarolas J, Jacks T. Double indemnity : p53, BRCA, and cancer. *Nat Med* 1997 ; 3 : 721-22.
- 102/ Rhei E, Bogomolny F, Ferderici MG. Molecular genetic characterization of BRCA1- and BRCA2-linked hereditary ovarian cancers. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 3193-6
- 103/ An HX, Beckman MF, Reifenger G, Bender HG, Niederacher D. Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 1999 ; 154 : 113-18
- 104/ Reedy MB, Hang T, Gallion H, Arnold S, Smith S. Antisense inhibition of BRCA1 expression and molecular analysis of hereditary tumors indicate that functional inactivation of the p53 DNA damage response pathway is required for BRCA-associated tumorigenesis. *Gynecol Oncol* 2001 ; 81 : 441-46
- 105/ Wang XZ, D'Andrea AD. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair* 2004 ; 3: 1063-69
- 106/ Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameiziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, Mok SC, D'Andrea AD. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA-pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med*. 2003 ; 9 : 568-74



- 107/ Taniguchi T, Jacquemont C. Disruption of the Fanconi Anemia pathway in human cancer in general population. *Cancer Biology & Therapy* 2006 ; 12 : 1637-39
- 108/ D'Andrea AD. The Fanconi Anemia/BRCA signaling pathway. *Cell Cycle* 2003 ; 2 : 290-92
- 109/ Wang Z, Li M, Lu S, Zhang Y, Wang H. Promoter hypermethylation of FANCF plays an important role in the occurrence of ovarian cancer through disrupting Fanconi Anemia-BRCA pathway. *Cancer Biology & Therapy* 2006 ; 5 : 256-60
- 110/ Lim SL, Smith P, Syed N, Coens C, Wong H, vander Burg M, Szlosarek P, Crook T, Green JA. Promoter hypermethylation of FANCF and outcome in advanced ovarian cancer. *Br J Cancer* 2008 ; 98 : 1452-56
- 111/ Kennedy RD, D'Andrea AD. The Fanconi Anemia/BRCA pathway : new faces in the crowd. *Genes Dev* 2005 ; 19 : 2925-40
- 112/ Deligdisch L, Gil J, Kerner H, Wu HS, Beck D, Gershoni-Baruch R. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. *Cancer* 1999; 86: 1544-50.
- 113/ Deligdisch L. Ovarian dysplasia: a review. *Int J Gynecol Cancer* 1997; 7: 89-94.
- 114/ Gusberg SB, Deligdisch L. Ovarian dysplasia, a study of identical twins. *Cancer* 54:1-4, 1984.
- 115/ Salazar H, Godwin AK, Daly MB, Laub PB, Hogan M, Rosenblum N, Boente MP, Lynch HT, Hamilton TC. Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1810/20.
- 116/ Werness BA, Afify AM, Bielat KL, Eltabbakh GH, Piver MS, Paterson JM. Altered surface and cyst epithelium of ovaries removed prophylactically from women with a family history of ovarian cancer. *Hum Pathol* 1999, 30: 151-157.
- 117/ Stratton JF, Buckey CH, Lowe D, Ponder BAJ. Comparison of prophylactic oophorectomy specimens from carriers and non carriers of a BRCA1 or BRCA2 gene mutation. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91 (7): 626-8.
- 118/ Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Webb PM, Green AC. Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2003; 104: 228-232.
- 119/ Hamilton TC, Godwin AK, Ozols RF. Carcinogenèse ovarienne, in *Cancer de l'ovaire*. Paris ; Arnette Blackwell, 1996 ; p21-38.
- 120/ Plaxe S, Deligdisch L, Dottino P, Cohen C. Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1990; 38: 367-72.

- 121/ Mittal KR, Jacquotte AZ, Cooper JL, Demopoulos R. Controlateral ovary in unilateral ovarian carcinoma: a search for preneoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 59-63.
- 122/ Tressera F, Grases PJ, Labastida R, Ubeda A. Histological features of the controlateral ovary in patients with unilateral ovarian cancer : a case control study. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 437-441.
- 123/ Gross AL, Kurman RJ, Vang R, Shih IM, Visvanathan K. Precursor lesions of high-grade serous ovarian carcinoma: morphological and molecular characteristics. *J Oncol* 2010
- 124/ Chen YE, Mehra K, Mehrad M, Ning G, Miron A, Mutter GL, Monte N, Quade BJ, McKeon FD, Yassin Y, Xian W, Crum CP. Secretory cell outgrowth, PAX2 and serous carcinogenesis
- 125/ Tung CS, Mok SC Tsang YT et al. PAX2 expression in low malignant potential ovarian tumors and low grade ovarian serous carcinomas. *Mod Pathol* 2009; 22: 1243-50.
- 126/ Roh MH, Yassin Y, Miron A et al. High grade fimbrial ovarian carcinomas are unified by altered p53, PTEN and PAX2 expression. *Mod Pathol* 2010 (In press)
- 127/ Chivukula M, Dabbs DJ, O'Connor S et al. PAX2: a novel Müllerian marker for serous papillary carcinomas to differentiate from micropapillary breast carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2009; 28: 570-78
- 128 Rabban JT, McAlhany S, Lerwill MF, Grenert JP, Zaloudek CJ. PAX2 distinguishes benign mesonephric and Mullerian glandular lesions of the cervix from endocervical adenocarcinoma including minimal deviation adenocarcinoma. *AM J Surg Pathol* 2010; 34: 137-146.
- 129/ Mehrad M, Ning G, Chen EY, Mehra KK, Crum CP. A pathologist's road map to benign, precancerous, and malignant intraepithelial proliferations in the Fallopian tube. *Adv Anat Pathol* 2010; 17: 293-302.
- 130/ Rabban JT, Krasik E, Chen LM, et al. Multistep level sections to detect occult fallopian tube carcinomas in risk-reducing salpingo-oophorectomies from women with BRCA mutations: implications for defining an optimal specimen dissection protocol. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 1878-85
- 131/ Leblanc E, Narducci F, Farre I, Peyrat JP, Taieb S, Adenis C, Vennin P. Radical fimbriectomy : a reasonable temporary risk-reducing surgery for selected women with a germ line mutation of BRCA1 or 2 genes ? Rationale and preliminary development. *Gynecol Oncol* 2011 ; 121 : 472-6.
- 132/ Przybycin CG, Kurman RJ, Ronnett BM, Shih IM, Vang R. Are all pelvic (Nonuterine) serous carcinomas of tubal origine ? *Am J Surg Pathol* 2010 ; 34 : 1407-16

- 133/ Carcangiu ML, Radice P, Manoukian S, Spatti G, Gobbo M, Pensotti V, Crucianelli R, Pasini B. Atypical epithelial proliferation in Fallopian tubes in prophylactic salpingo-oophorectomy specimens from BRCA 1 and BRCA 2 germline mutation carriers. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 23: 35-40.
- 134/ Yanai-Inbar I, Siriaunkgul S, Silverberg SG. Mucosal epithelial proliferation of the fallopian tube: a particular association with ovarian serous tumor of low malignant potential? *Int J Gynecol Pathol* 1995; 14: 107-13.
- 135/ Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP. Dysplastic changes in prophylactic removed fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol* 2001 2001 ; 195 : 451-6.
- 136/ Schloosshauer PW, Cohen CJ, Penault-Llorca F, Miranda CR, Bignon YJ, Dauplat J, Deligdisch L. Prophylactic oophorectomy. *Cancer* 2003; 98: 2599-606.
- 137/ Espina V, Milia J, Wu G, Cowherd S, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Methods Mol Biol* 2006 ; 319: 213-29
- 138/ Domazet B, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R, Cheng L. Laser capture microdissection in the genomic and proteomic era : targeting the genetic basis of cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2008 ; 1: 475-88
- 139/ Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002 ; 18 : 74-82
- 140/ Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 2001 ; 38 : 740-4.
- 141/ Malan V, Lapierre JM, Vekemans M, Romana SP. Array CGH. : a revolution in medical cytogenetics. *IRBM* 2007 ; 5 : 245-51
- 142/ Deligdisch L, Gil J, Kerner H, Wu HS, Beck D, Gershoni-Baruch R. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. Cytogenetic and morphometric correlations. *Cancer* 1999; 86: 1544-50.
- 143/ Deligdisch L, Gil J. Characterization of ovarian dysplasia by interactive morphometry. *Cancer* 1989; 63: 748-55.
- 144/ Brown J, Farquhar C, Beck J, Boothroyd C, Hugues E. Clomiphene and anti-oestrogens for ovulation induction in PCOS. *Cochrane Database Syst Rev* 2009 ; 4 : CD002249.
- 145/ Ting AY, Kimler BF, Fabian CJ, Petroff BK. Tamoxifen prevents premalignant changes of breast, but not ovarian cancer in rats at high risk for both diseases. *Cancer Prev Res* 2008 ; 1 : 546-53.

- 146/ Pickel H, Reich O, Tamussino K. Bilateral atypical hyperplasia of the fallopian tube associated with tamoxifen : a report of two cases. *Int J Gynecol Pathol* 1999 ; 17 : 284-5.
- 147/ Diwan BA, Anderson LM, Ward JM. Proliferative lesions of oviduct and uterus in CD-1 mice exposed prenatally to tamoxifen. *Carcinogenesis* 1997 ; 18 : 2009-14
- 148/ Ponnusamy MP, Batra SK. Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells. *J Ov Research* 2008; 4: 1-9
- 149/ Dylla S, Gayther SA, Dafou D. Cancer stem cells and epithelial ovarian cancer. *J Oncol* 2010; In press
- 150/ Foulkes WD. BRCA1 functions as a breast stem cell regulator. *J Med Genet* 1994; 41: 1-5
- 151/ Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Foco H, Kleer CG, Merajver SD, Dontu G, Wicha MS. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *PNAS* 2008; 105: 1680-85
- 152/ Ginestier C, Wicinski J, Cervera N, Monville F, Finetti P, Bertucci F, Wicha MS, Birnbaum D, Charafe-Jauffret E. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation *Cell Cycle* 2009; 8: 3297-3302
- 153/ Heerma van Voss MR, Van der Groep P, Bart Joost, Van der Wall E, Van diset PJ. Expression of the stem cell marker ALDH1 in the normal breast pf BRCA1 mutation carriers
- 154/ Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-67.
- 155/ Penumatsa K, Edassery SL, Barua A, Bradaric MJ, Luborsky JL. Differential expression of aldehyde dehydrogenase 1a1 (ALDH1) in normal ovary and serous ovarian tumors. *J Ov Research* 2010 ; 28 : 1-13
- 156/ Chang B, Liu G, Xue F, Rosen DG, Xiao L, Wang X, Liu J. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Modern Pathol* 2009; 22: 817-23.
- 157/ Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier F, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens P, Wicha MS. Aldehyde dehydrogenase 1 positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010 ; 16 : 45-55.
- 158/ Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Butzow R, Coukos G, Zhang L. Distinct expression

levels and patterns of stem cell marker, Aldehyde Dehydrogenase Isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *Plos One* 2010.

159/ Kryczek I, Liu S, Roh M, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Banerjee M, Mao Y, Kotarski J, Wicha MS, Liu R, Zou W. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *Int J Cancer* 2011 ; In press

160/ Climent J, Garcia JL, Mao JH, Arsuaga J, Perez-Losada J. Characterization of breast cancer by array comparative genomic hybridization. *Biochem Cell Biol* 2007 ; 85 : 497-508

161/ Davies JJ, Wilson IM, Lam WL. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome Research* 2005 ; 13 : 237-48

162/ Theillet C, Orsetti B, Redon R, Manoir S. Le typage génomique: de la cytogénétique moléculaire aux puces à ADN. *Bull Cancer* 2001; 88: 261-8

163/ Weiss MM, Hermsen MAJA, Meijer GA, van Grieken NCT, Baak JPA, Kuipers EJ, van Diest PJ. Demystified...Comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* 1999; 52: 243-51.

164/ Fishman A, Shalom-Paz E, Fejgin M, Gaber E, Altaras M, Amiel A. Comparing the genetic changes detected in the primary and secondary tumor sites of ovarian cancer using comparative genomic hybridization. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 ; 15 : 261-6

165/ Hu J, Khanna V, Jones MW, Surti U. Comparative study of primary and recurrent ovarian serous carcinomas : comparative genomic hybridization analysis with a potential application for prognosis. *Gynecol oncol* 2003 ; 89 : 369-75.

166/ Israeli O, Gotlieb WH, Friedman E, Goldman B, Ben-Baruch G, Aviram-Goldring A, Rienstein S. Familial vs sporadic ovarian tumors: characteristic genomic alterations analyzed by CGH. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 629-36.

167/ Bruchim I, Israeli O, Mahmud SM, Aviram-Goldring A, Rienstein S, Friedman E, Ben-Baruch G, Gotlieb WH. Genetic alterations detected by comparative genomic hybridization and recurrence rate in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2009; 190: 66-70

168/ Tapper J, Sarantaus L, Vahteristo P, Nevanlinna H, Hemmer S, Seppala M, Knuutila S, Butzow R. Genetic changes in inherited and sporadic ovarian carcinomas by comparative genomic hybridization: extensive similarity except for a difference at chromosome 2q24-q32. *Cancer Res* 1998; 58: 2715-9

169/ Patael-Karasik Y, Daniely M, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Schiby J, Barakai G, Goldman B, Aviram A, Friedman E. Comparative genomic hybridization in inherited and sporadic ovarian tumors in Israel. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 121: 26-32.

- 170/ Garnis C, Campbell J, Davies JJ, Macaulay C, Lam S, Lam WL. Involvement of multiple developmental genes on chromosome 1p in lung tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 475-82
- 171/ Nowee ME, Snidjers AM, Rockx DAP, Wit RM, Kosma VM, Hamalainen K, Schouten JP, Verheijen RHM, van Diest PJ, Alberston DG, Dorsman JC. DNA profiling of primary serous ovarian and Fallopian tube carcinomas with array comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Pathol* 2007; 213: 46-55
- 172/ Nemos C, Bursztejn AC, Jonveaux P. Management of the CNVs in constitutional human genetics using array CGH. *Pathol Biol* 2008; 56: 354-61
- 173/ Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010 ; 31 : 9-18
- 174/ Svenson U, Roos G. Telomere length as a biological marker in malignancy. *Bioch & Bioph Acta* 2009 ; 1792 : 317-23.
- 175/ Kruk PA, Godwin AK, Hamilton TC, Auersperg N. Telomeric instability and reduced proliferative potential in ovarian surface epithelial cells from women with a family history of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999 ; 73 : 229-236
- 176/ Kuhn E, Meeker A, Wang TL, Sehdev AS, Kurman RJ, Shih IM. Shortened telomeres in serous tubal intraepithelial carcinoma : an early event in ovarian high-grade serous carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 2010 ; 34 : 829-36
- 177/ Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acid Res* 2002 ; 30 : 1-6
- 178/ Hackett JA, Greider CW. Balancing instability : dual roles for telomerases and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* 2002 ; 21 : 619-26
- 179/ Colgin LM, Baran K, Baumann P, Cech TR, Reddel RR. Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol* 2003 ; 13 : 942-6
- 180/ Lei M, Zaug AJ, Podell ER, Cech TR. Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 20449-56
- 181/ Murakami J, Nagai N, Ohama K, Tahara H, Ide T. Telomerase activity in ovarian tumors. *Cancer* 1997 ; 80 : 1085-92
- 182/ Hu H, Zhang Y, Zou M, Yang S. Expression of TRF1, TRF2, TIN2, TERT, KU70, and BRCA1 proteins is associated with telomere shortening and may contribute to multistage carcinogenesis of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010 ; 136 : 1407-14.

- 183/ Wang SJ, Sakamoto T, Yasuda SI, Fukasawa I, Ota Y, Hayashi M, Okura T, Zheng JH, Inaba N. The relationship between telomere length and telomerase activity in gynecologic cancers. *Gynecol Oncol* 2002 ; 84 : 81-84.
- 184/ Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC.  $\gamma$ H2AX as a molecular marker of aging and disease. *Epigenetics* 2010 ; 2 : 129-36
- 185/ Clingen PH, Wu JYH, Miller J, Mistry N, Chin F, Wynne P, Prise KM, Hartley JA. Histone H2AX phosphorylation as a molecular pharmacological marker for DNA interstrand crosslink cancer chemotherapy. *Bioch Pharmacol* 2008 ; 76 : 19-27
- 186/ Plesca D, Mazumder S, Almasan A. DNA damage response and apoptosis. *Methods Enzymol* 2008 ; 446 : 107-22.
- 187/ Crum CP, Drapkin R, Kindelberger D, Medeiros F, Miron A, Lee Y. Lessons from BRCA. The tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clin Med Res* 2007 ; 5 : 35-44
- 188/ Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci MR, Medeiros F, Saleemuddin A, Garber J, Birch C, Mou H, Gordon RW, Cramer DW, McKeon FD, Crum CP. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol* 2007 ; 211 : 26-35

## Iconographie :

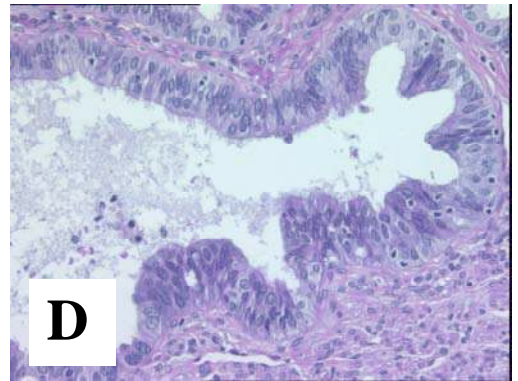
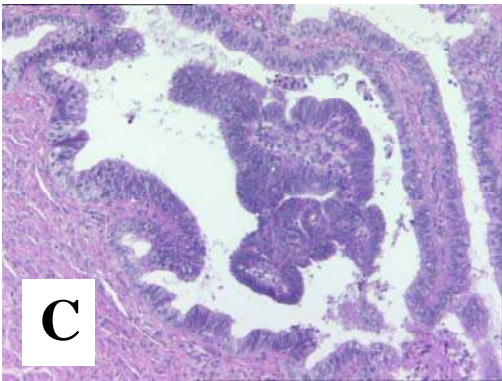
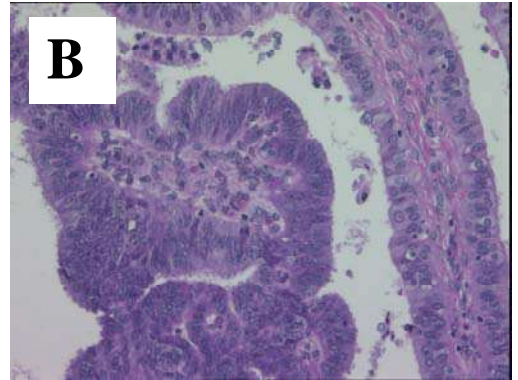
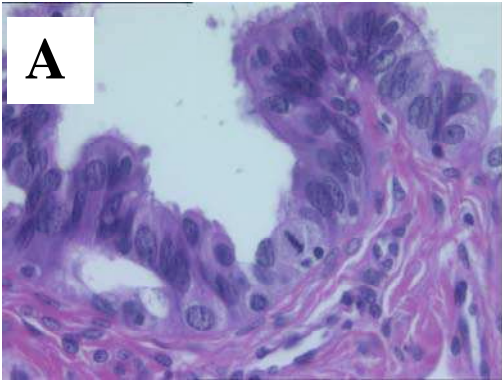
### 1/ Dysplasie tubaire :

A : Atypies nucléaires, HES x 40

B : perte de la ciliation, HES x 20

C : perte de la polarité, HES x 5

D : présence de touffes, HES x 20





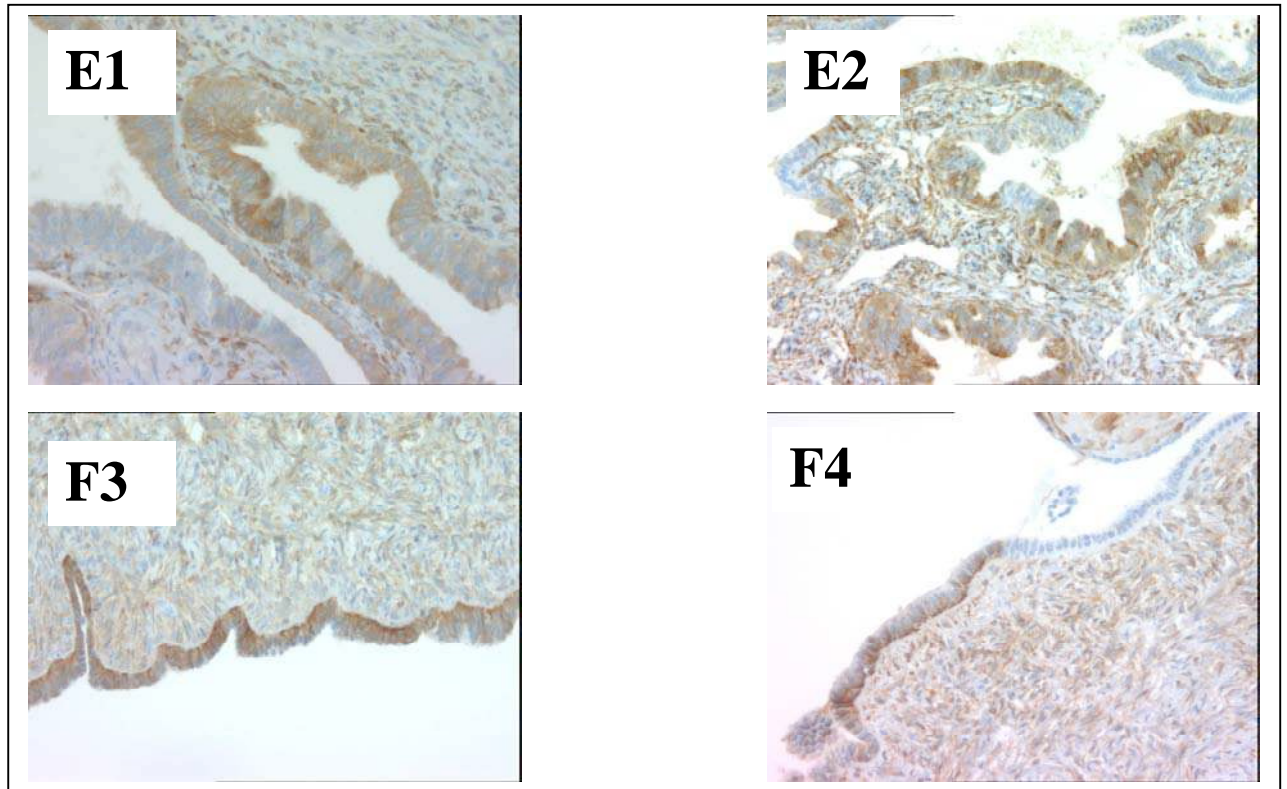
## 2/ Immunohistochimie :

E1 : Dysplasie tubaire, ALDH1 x 20

E2 : Dysplasie tubaire, ALDH1 x 10

F1 : Dysplasie ovarienne, ALDH1 x 20

F2 : Dysplasie ovarienne, ALDH1 x 20

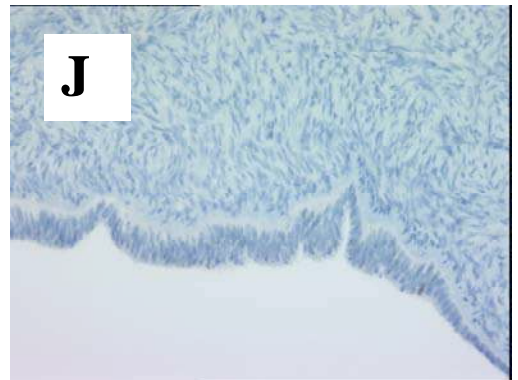
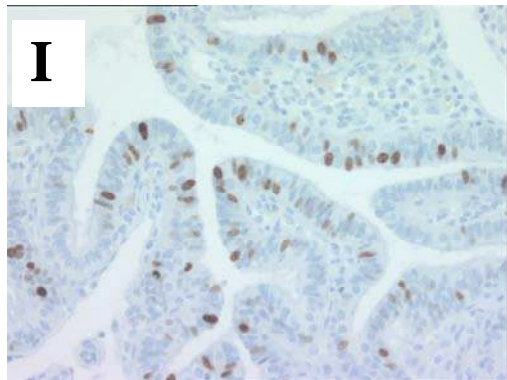
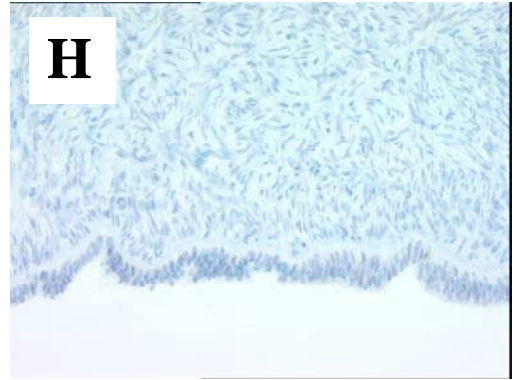
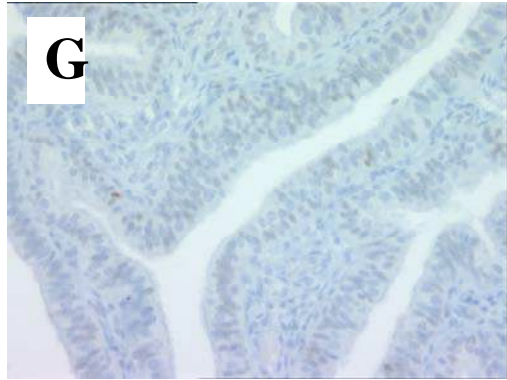


G : Dysplasie tubaire, p53 x 20

H : Dysplasie ovarienne, p53 x 20

I : Dysplasie tubaire, Ki67 x 20

J : Dysplasie ovarienne, Ki67 x 20

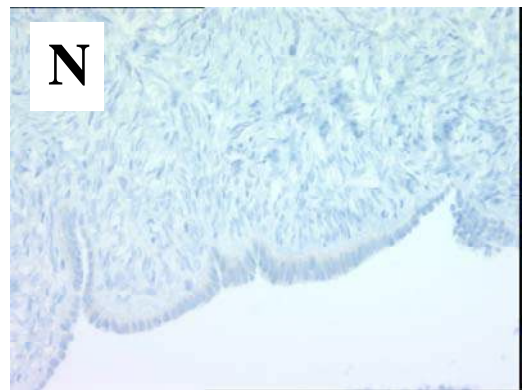
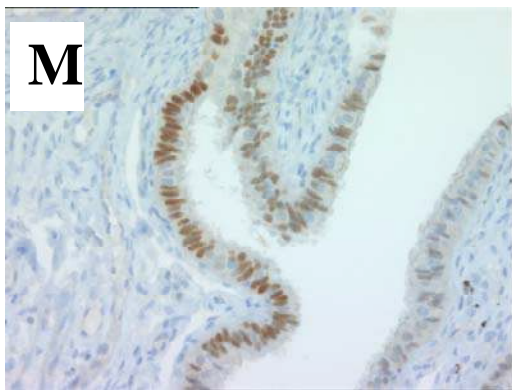
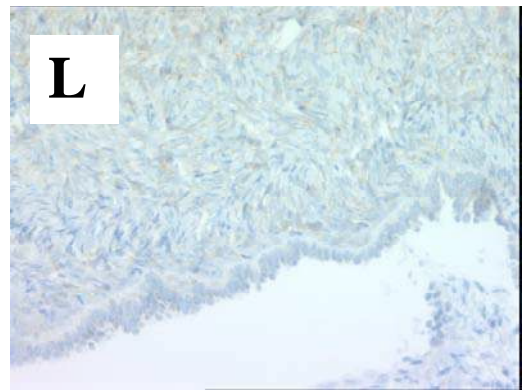
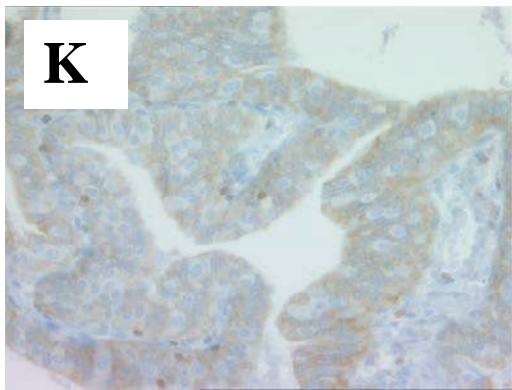


K : Dysplasie tubaire, Bcl2 x 20

L : Dysplasie ovarienne, Bcl2 x 20

M : Dysplasie tubaire, PAX2

N : Dysplasie ovarienne, PAX2

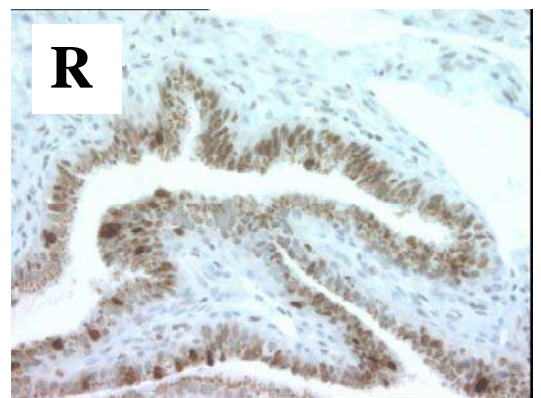
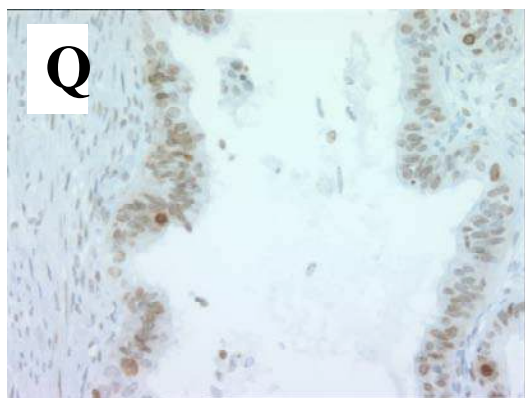
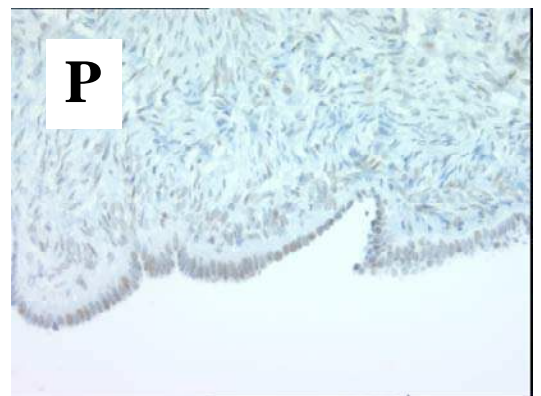
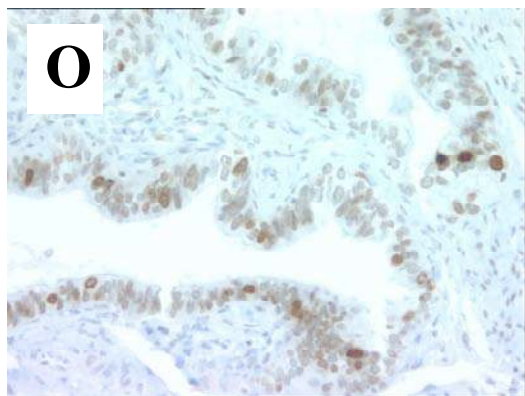


O : Dysplasie tubaire,  $\lambda$ H2AX x 20

P : Dysplasie ovarienne,  $\lambda$ H2AX x 20

Q : Dysplasie tubaire,  $\lambda$ H2AX x 20

R : Dysplasie tubaire,  $\lambda$ H2AX x 20





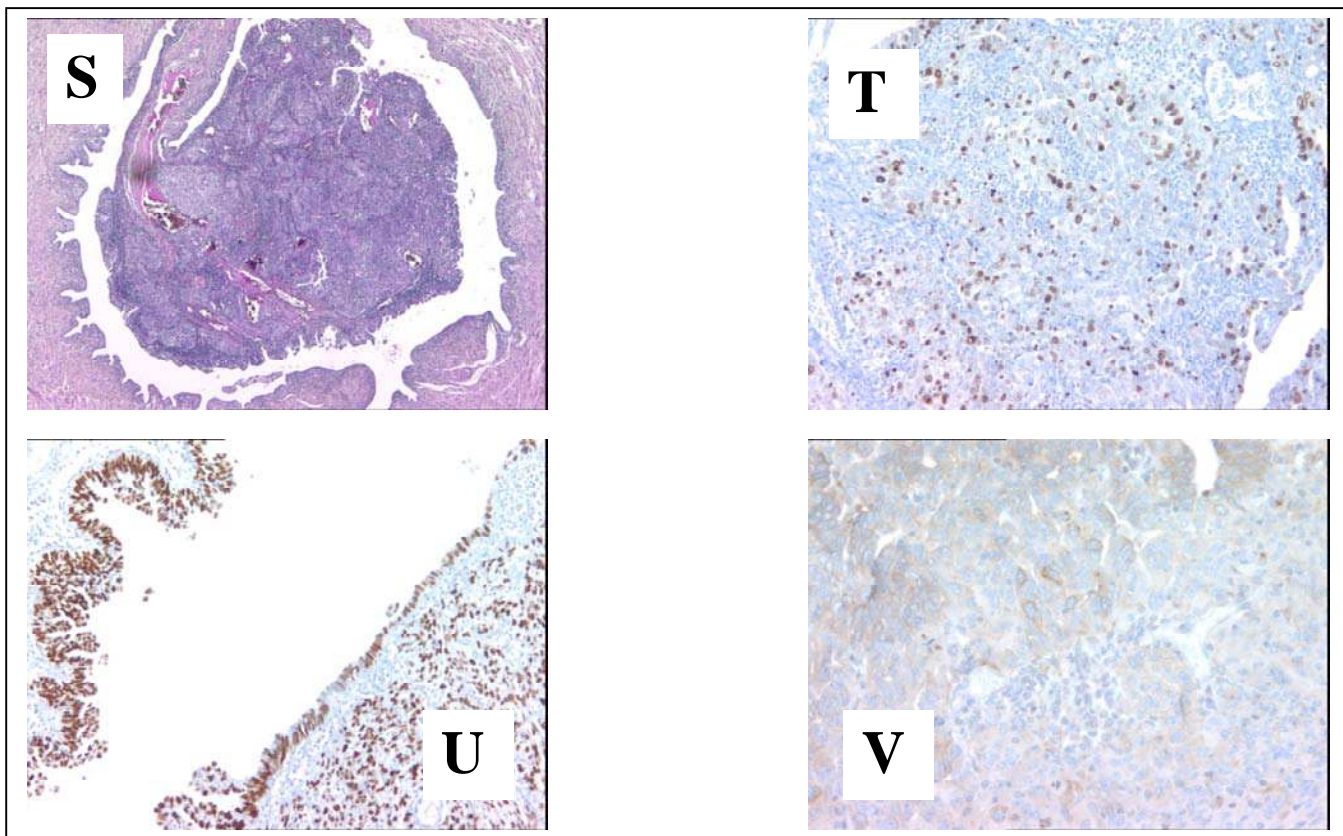
## STIC

S : HES x 2.5

T : Ki67 x 10

U : p53 x 10

V : PAX2, x 10



## STIC

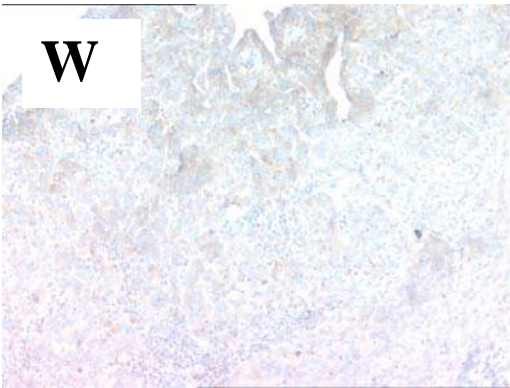
W : Bcl2 x 20

X :  $\lambda$ H2AX x 20

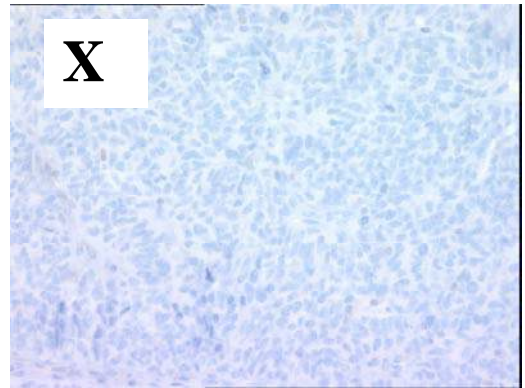
Y : p53 x 10

Z :  $\lambda$ H2AX x 10

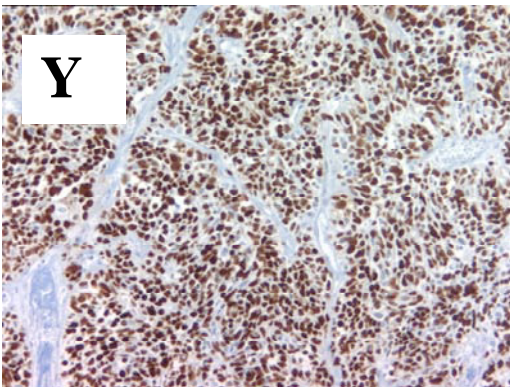
**W**



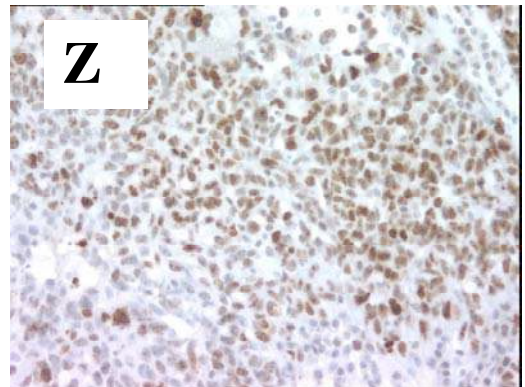
**X**



**Y**



**Z**



## Annexe 1 : protocole d'amplification et de purification de l'ADN

### **AMPLIFICATION (Kit GenomePlex Complete Whole Genome Amplification WGA-Sigma)**

#### **Fragmentation :**

- 1/ Préparation de la solution d'ADN à 2 ng/μl
- 2/ Ajouter 1 μl de « 10 x fragmentation buffer » à 10 μl de l'échantillon d'ADN (2 ng/μl) dans un tube PCR
- 3/ Placer le tube dans un bloc chauffant à 95°C pendant EXACTEMENT 4 minutes.
- 4/ Refroidir immédiatement sur glace puis centrifuger brièvement et remettre dans la glace

#### **Library preparation :**

- 5/ Ajouter 2 μl de « 1 x library preparation buffer » à chaque échantillon
- 6/ Ajouter 1 μl de la solution de stabilisation library
- 7/ Vortexer puis centrifuger et placer à 95°C pdt 2 min dans thermocycleur
- 8/ Refroidir sur glace, centrifuger les échantillons et refroidir sur glace
- 9/ Ajouter 1 μl de Library preparation enzyme dans chaquetube. Vortexer et centrifuger
- 10/ Placer en thermocycleur pdt :
  - 16°C pdt 20 min
  - 24°C pdt 20 min
  - 37°C pdt 20 min
  - 75 °C pdt 5 min
  - 4°C pause

- 11/ Enlever les échantillons et centrifuger. Puis amplifier ou conserver à -20°C pdt 3 jours

#### **Amplification :**

- 12/ Préparer le mix en ajoutant à 15 μl de votre échantillon :

- 7.5μl de « 10 x Amplification Master Mix »
- 47.5 μl de Nuclease-free water
- 5 μl de WGA DNA Polymerase

Ce qui fera un volume total de 75 μl

- 13/ Vortexer, centrifuger et placer en thermocycleur :

- Denaturation initial : 95°C pdt 3 minutes
- 14 cycles suivant : - dénaturation 94°C pdt 15 secondes  
- amorçage/extension 65°C pdt 5 minutes

Maintenir ensuite à 4°C ou conserver à -20°C jusqu'à l'étape de purification.

	10 RXN	50 RXN	500 RXN
10 x Fragmentation buffer	12 $\mu$ l	55 $\mu$ l	550
1 x Library Preparation buffer	22 $\mu$ l	110 $\mu$ l	1.1 ml
Library preparation solution	12 $\mu$ l	55 $\mu$ l	550 $\mu$ l
Library preparation enzyme	12 $\mu$ l	55 $\mu$ l	550 $\mu$ l
10 x Amplification Master Mix	80 $\mu$ l	410 $\mu$ l	4.1 ml
WGA DNA Polymerase	55 $\mu$ l	275 $\mu$ l	2.75 ml
Nuclease-free Water	1 x 1.5 ml	2 x 1.5 ml	2 x 15 ml
Control Human Genomic DNA	10 $\mu$ l (5 ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l (5 ng/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l (5 ng/ $\mu$ l)



## **PURIFICATION (Kit GenElute PCR Clean-Up – Sigma)**

### **Préparation :**

- 1/ Mixer les réactifs. S'il y a précipitation, chauffer à 55-60°C pour la dissoudre et refroidir à température ambiante
- 2/ Solution de lavage : diluer cette solution avec 48 ml d'éthanol 100%. Après chaque utilisation, refermer la solution de lavage diluée pour éviter l'évaporation d'éthanol

### **Conservation :**

Conserver à température ambiante

### **Procédure :**

Toutes les centrifugations se dérouleront à 12.000-16.000 g

1/ insérer une colonne dans le tube collecteur. Ajouter 0.5 ml de Column preparation Solution dans chaque colonne et centrifuger à 12.000 g pdt 30 s à 1 min. Jeter l'éluat

2/ Ajouter 5 volumes de Binding solution à 1 volume de l'échantillon de PCR. (exemple : ajouter 500 µl de Binding solution à 100 µl de l'échantillon de PCR). Transférer la solution dans la colonne. Centrifuger la colonne entre 12.000-16.000 g pdt 1 min. Jeter l'éluat mais conserver le tube collecteur

3/ Replacer la colonne dans le tube collecteur. Ajouter 0.5 ml de diluted Wash Solution dans la colonne et centrifuger à vitesse max pdt 1 min. Jeter l'éluat mais conserver le tube collecteur

Ajouter bien de l'éthanol à la Wash solution Concentrate avant la première utilisation.

4/ Replacer la colonne dans le tube collecteur. Centrifuger la colonne à vitesse max pdt 2 min, sans rajouter de wash solution, pour enlever l'excès d'éthanol. Jeter tout éluat supplémentaire ainsi que le tube collecteur.

5/ Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 ml. Ajouter 50 µl de Elution Solution ou d'eau dans le centre de chaque colonne. Laisser à température ambiante pdt 1 minute.

En cas d'utilisation d'eau, vérifier que le pH de l'eau se situe entre 5.5 et 8.5. L'élution peut aussi se faire avec la Elution Solution diluée 10 fois avec de l'eau.

6/ Pour éluer l'ADN, centrifuger la colonne à vitesse max pdt 1 min. Le produit d'amplification PCR est prêt immédiatement ou à conserver à -20°C.

## Annexe 2 : protocole CGH

### Marquage (Kit Bioprime Total Genomic Labelling- Invitrogen)

#### Réactifs

Alexa Fluor 3 Oligo aCGH 2X Reaction Mix

Alexa Fluor 5 Oligo aCGH 2X Reaction Mix

Exo-Klenow

\*Sortir les alexa pour les faire décongeler à 4 °C et à l'abri de la lumière.

\*Vortexer les tubes, centrifuger brièvement et les mettre dans la glace.

\*Préparer pour chaque ADN à marquer, un tube de 0,5 ml.

\*Ajouter comme suit les différents réactifs dans chaque tube de 0,5 ml suivant le type de marquage Alexa 3 ou 5 :

-25 µl d'Alexa Fluor 3 Oligo aCGH 2X Reaction Mix **ou** Alexa Fluor 5 Oligo aCGH 2X Reaction Mix

-17,6 µl de l'ADN purifié et digéré et 4,4 µl EDTA

\*Mélanger par pipetage up and down et incuber 5minutes à 95°C et mettre immédiatement 5 min dans la glace.

\*Sur la glace, mettre 3 µl d'Exo-Klenow dans chaque tube.

\*Vortexer, et centrifuger brièvement.

\*Incuber 2 heures à 37°C.

\*Après incubation, si on conserve les produits de marquage un certain temps mettre 5 µl de tampon stop. Si on purifie directement, ne pas faire cette étape.

## Purification des produits de Marquage: **Kit Purification Module B Réactifs**

**Purification Module B with Purelink™** Shipped and store at room temperature.

Component	10-reaction kit	30-reaction kit
PureLink™ Spin Columns with Collection Tubes	10 columns/ tubes	30 columns/ tubes
Binding Buffer (B2) (combine with 100% isopropanol; see next page)	9 ml	9 ml
Wash Buffer (combine with 100% ethanol; see next page)	11 ml	11 ml
Elution Buffer (E1)	3 ml	3 ml
Amber Recovery Tubes	10 tubes	30 tubes

**Attention : Resuspendre le tampon B2 Binding buffer avec 6 ml d'isopropanol et le tampon de lavage Wash buffer avec 40 ml d'éthanol 100%**

\*Ajouter 200 µl de Binding Buffer B2 dans chaque tube contenant le produit de marquage et vortexer brièvement.

\*Mettre les échantillons sur les colonnes et centrifuger 1 minute à 10.000g , jeter l'éluat et remettre la colonne sur le tube collecteur.

\*Ajouter 650 µl de tampon Wash buffer sur chaque colonne.

\*Centrifuger 1 minute à 10 000 g, jeter l'éluat et remettre la colonne sur le tube collecteur.

\*Centrifuger au maximum, pendant 2 à 3 minutes.

\*Jeter le tube collecteur et placer la colonne sur un tube de 1,5 ml propre opaque (marron) et ajouter 55 µl de tampon d'élution E1 au centre de la colonne et attendre 1 minute.

\*Centrifuger à vitesse maxi 20 000g pendant 2 minutes.

\*Speedvaquer pour obtenir un culot et resuspendre ce culot avec 21 µl de tampon E1

\*Prendre une DO au nanodrop, utiliser comme blanc le tampon E1.

Prendre l'option Microarray et comme longueur d'onde le plus proche de

**Alexa Fluor® 3 555/565 nm Pink (Alexa Fluor 555)**

**Alexa Fluor® 5 650/670 nm Light blue (Alexa Fluor 660)**

**Il faut une valeur > 7 pmol/µl**

On peut procéder directement à l'hybridation ou les conserver à -20°C pour la nuit.

## 5) Hybridation

### Hybridation sur lames CGH .4x180K Agilent

- Décongeler l'agent bloquant 20 minutes à l'avance.
- Equilibrer le bain-marie à 37°C et le bloc chauffant à 95°C.
- Allumer le four à hybridation et vérifier la température affichée (65°C)
- **Combiner 19,5 µl d'Alexa 3 et 19.5 µL d'Alexa 5 selon le plan de dépôt automatique**

Préparer les échantillons d'hybridation :

	Pour 1 tube en 180K
Mélange ADN marqué cyanine 3 et cyanine 5	39 µL
Human ADN Cot-1 (1.0mg/ml)	5 µL
Agent bloquant 10X	11 µL
Tampon Hybridation 2X	56 µL

- Mélanger par pipetage et X doucement par retournement
- Dénaturer à 95°C pendant 3 minutes puis mettre dans la glace.
- Pré-hybrider immédiatement à 37°C pendant 30 minutes, X 1 minute à 17 900g.
- Sortir les chambres, les gaskets et les lames.
- **Compléter le plan de dépôt pour identifier les N° de lames sur lesquelles seront déposés les mix de patients.**
- Manipuler la lame Agilent et la gasket avec une pince.
- Manipuler la lame avec les doigts seulement sur la tranche.
- Ne jamais toucher la surface de la lame.
- Déposer la gasket sur la chambre joint sur le dessus.

- Déposer doucement **les** 111µl pour les 180K.

La sonde est déposée en partant du milieu et en l'étalant sur la gauche et sur la droite, doucement sans faire de bulles.

Ne pas déposer tout le volume, laisser la dernière goutte dans le cône pour éviter de créer des bulles.

- Placer la lame Agilent dans **le sens Agilent regarde Agilent**.
- Fermer correctement la chambre avec la vis. Faire tourner le liquide pour vérifier qu'il n'y ait pas de bulles formées. Sinon tapoter avec une pince pour les faire disparaître.

- **Hybrider à 65°C pendant 24 heures à 20 rpm**

Le four à hybridation doit être équilibré et la température calibrée.

**La veille de l'étape de lavage+++.**

- Remplir le bac en verre N°3 avec environ 230 mL de solution de lavage 2.
- Recouvrir le bac avec son couvercle N°3 et entourer le bord de parafilm.
- Préchauffer l'ensemble à l'étuve en réglant la température à 37°C pendant une nuit.

## 6) LAVAGE

\*Sortir le bac N°3 rempli de tampon de lavage N°2 et le mettre à tourner et chauffer à 37°C sur l'agitateur chauffant.

\*Remplir 2 bacs de tampon de lavage 1, l'un avec 100 ml (bac N°1), l'autre avec 230 ml (bac N°2)

\*Sortir les chambres d'hybridation une par une du four. Procéder de la même pour chaque lame :

- Enlever la lame + gasket de la chambre, désolidariser, la gasket de la lame dans le bac N°1, et la mettre sur le portoir dans le bac N° 2
- Faire de même pour les autres lames.
- Une fois toutes les lames dans le bac N°2, faire tourner 5 minutes
- Sortir le portoir et le mettre 1 minute dans le bac N°3
- Au bout d'une minute, sortir délicatement les lames à l'aide du portoir.

## **Article 1:**

**Chene G**, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Dauplat MM, Mishellany F, Tardieu AS, Pomel C, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly JL, Dechelotte P, Dauplat J. Dysplasie épithéliale de l'ovaire: Mythe ou réalité? **Gyn Obst Fertil. 2008, 36 (7-8): 800-7. IF= 0.45**

Cet article est une revue de la littérature sur le concept de dysplasie ovarienne

Mise au point

## Dysplasie épithéliale ovarienne : mythe ou réalité ?

### Revue de la littérature

## Ovarian epithelial dysplasia: Myth or reality? Review

G. Chêne<sup>a,\*</sup>, F. Penault-Llorca<sup>c</sup>, G. Le Bouëdec<sup>a</sup>, F. Mishellany<sup>c</sup>, M.-M. Dauplat<sup>c,d</sup>,  
A.-S. Tardieu<sup>a</sup>, C. Pomel<sup>a</sup>, P. Jaffaux<sup>c</sup>, B. Aublet-Cuvelier<sup>c</sup>, J.-L. Pouly<sup>f</sup>,  
P. Déchelotte<sup>d</sup>, J. Dauplat<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Département de chirurgie, centre Jean-Perrin, rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> Département de gynécologie et obstétrique, hôpital Nord, CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne cedex 2, France

<sup>c</sup> Département d'anatomopathologie, centre Jean-Perrin, rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>d</sup> Département d'anatomopathologie, Hôtel-Dieu, Polyclinique, CHU de Clermont-Ferrand, 63033 Clermont-Ferrand, France

<sup>e</sup> Département d'information médicale, CHU de Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>f</sup> Département de gynécologie et obstétrique, Hôtel-Dieu, Polyclinique, CHU de Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France

Reçu le 29 avril 2008 ; accepté le 27 mai 2008

Disponible sur Internet le 25 juillet 2008

### Résumé

La dysplasie épithéliale de l'ovaire a été décrite grâce aux études anatomopathologiques, morphométriques et caryométriques. Elle pourrait représenter un précurseur potentiel du cancer de l'ovaire chez les patientes à risque génétique, bien que son évolution naturelle soit inconnue. Son identification serait donc probablement fondamentale dans la compréhension des étapes précoces de la cancérogenèse ovarienne. En revanche, la description récente de dysplasie après induction de l'ovulation et son profil différent par rapport à la dysplasie des ovaires à risque génétique pourraient expliquer une évolution différente. Nous proposons de définir le concept histopathologique de dysplasie ainsi que les recommandations de prise en charge clinique.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### Abstract

Ovarian epithelial dysplasia has been described in the ovarian surface epithelium by histologic, morphometric and nuclear profile studies. It could represent a potential precursor of ovarian malignancy in patients with genetic risk of ovarian cancer, although its natural history and progression to carcinoma are unpredictable. Diagnosis and identification of ovarian dysplasia would certainly be useful to understand the early steps of ovarian carcinogenesis. However, dysplasia in relation with ovulation induction seems to have a different pattern. We report dysplasia definitions and the current clinical management.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Stérilité ; Dysplasie ovarienne ; Stimulation de l'ovulation ; Annexectomie prophylactique ; Mutation BRCA ; Cancer de l'ovaire ; Carcinogénèse ovarienne

**Keywords:** Infertility; Ovarian dysplasia; Ovulation stimulation; Prophylactic oophorectomy; BRCA mutation; Ovarian carcinoma; Ovarian carcinogenesis

### 1. Introduction

Le cancer épithélial de l'ovaire est le plus grave des cancers gynécologiques, avec une incidence rapportée à 4488 au cours de l'année 2000, en France, et avec une survie faible à cinq ans, estimée à 35 % tous stades confondus [1].

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [chenegautier@yahoo.fr](mailto:chenegautier@yahoo.fr) (G. Chêne).

Cette gravité s'explique essentiellement par un diagnostic tardif dans deux tiers des cas, au stade de carcinose péritonéale, grevant le pronostic avec une survie inférieure à 20 % [2].

En revanche, les chances de guérison sont d'environ 90 % lorsque le cancer est diagnostiqué à un stade précoce (stade IA), et de 70 % au stade II [3]. Cependant, le manque de spécificité et la faible valeur prédictive positive des tests habituels de dépistage (échographie et dosage du marqueur CA 125) d'une part, et d'autre part, notre méconnaissance de la carcinogenèse ovarienne ne permettent pas d'isoler une phase de latence préclinique propice à une attitude interventionnelle préventive.

À l'instar de l'existence connue et reconnue de lésions précancéreuses vulvaires, vaginales, cervicales ou encore endométriales, et des possibilités et facilités de dépistage, de diagnostic et de traitement précoce, la même question peut se poser en ce qui concerne l'ovaire. La dysplasie ovarienne est-elle précurseur du cancer ? Si tel est le cas, peut-on individualiser un état précancéreux dysplasique précurseur de la maladie permettant d'intervenir suffisamment tôt pour stopper le processus de carcinogenèse ?

## 2. Description histopathologique

### 2.1. Dysplasie et risque génétique

La prédisposition héréditaire (antécédents familiaux et/ou mutations génétiques BRCA 1 ou 2) est un des plus importants facteurs de risque de cancer du sein et de l'ovaire et concernerait 5 à 10 % de l'ensemble des cancers de l'ovaire [4]. En particulier, les mutations génétiques BRCA 1 et 2 sont responsables d'au moins 75 % des cancers héréditaires de l'ovaire avec dans ce cas un risque individuel estimé entre 10 à 40 % [5] : ces patientes sont donc des candidates idéales à des techniques adaptées de prévention primaire. Se fondant sur une pénétrance moyenne pour le cancer de l'ovaire de 10 % à l'âge de 40 ans, la conférence de consensus de Bethesda de 1994 [6] recommande la réalisation d'une ovariectomie prophylactique, après 35 ans ou dès qu'il n'y a plus de désir de grossesse, chez les patientes aux antécédents familiaux de cancer du sein et/ou de l'ovaire et/ou porteuses de la mutation BRCA1 et 2. L'examen macroscopique des pièces opératoires est le plus souvent normal alors que les analyses microscopiques peuvent montrer des anomalies histopathologiques qualifiées de dysplasie ovarienne ou de lésions précancéreuses ovariennes.

La première description a été rapportée par l'étude de Gusberg et Deligdish en 1984 [7], grâce à l'examen de pièces d'annexectomie prophylactique de trois jumelles monozygotes dont l'une était porteuse d'un cancer invasif de l'ovaire.

Dans les trois cas, les ovaires étaient macroscopiquement normaux. En revanche, l'analyse microscopique révélait diverses anomalies cytologiques et architecturales : papillomatose de surface, kystes d'inclusion, pléiomorphisme nucléaire, pseudo-stratification épithéliale, et invaginations épithéliales.

Par analogie aux autres lésions précancéreuses du tractus génital, l'association de ces différentes anomalies était alors dénommée dysplasie épithéliale de l'ovaire.

Salazar et al., en 1996 [8], ont comparé les ovaires de 20 patientes à haut risque par rapport à 20 patientes sans antécédents familiaux. Ils retrouvaient des stigmates de dysplasie au niveau des annexectomies prophylactiques des patientes à risque élevé : papillomatose de surface, pseudo-stratification épithéliale, kystes d'inclusion, invaginations épithéliales et hyperplasie stromale, ainsi que deux cas de cancers microinvasifs occultes. Même si seulement neuf patientes sur 20 avaient une mutation BRCA1 démontrée, leur étude concluait à un phénotype de lésions précancéreuses aussi bien chez les patientes avec mutation connue que les patientes à haut risque du fait de leurs antécédents familiaux de néoplasie gynécologique.

Werness et al., en 1999 [9], retrouvaient une augmentation isolée du nombre de kystes d'inclusion dans son étude réalisée en insu sur 64 annexectomies prophylactiques de patientes à haut risque par rapport à 30 témoins. À l'opposé de l'étude de Salazar et al., les autres anomalies telles que papillomatose ou hyperplasie stromale n'étaient pas retrouvées avec une fréquence accrue. De la même façon, d'autres études réalisées en insu sur des annexectomies prophylactiques pour mutation BRCA1 ou 2 ne montraient aucune anomalie significative par rapport aux témoins [10,11]. Devait-on conclure à l'absence de dysplasie chez les porteuses de la mutation BRCA1 ou 2 ?

D'une part, les résultats négatifs de ces études peuvent être imputés à des problèmes techniques, car les ovaires n'ont pas été examinés dans leur totalité. Or, la manipulation des pièces opératoires est délicate, source de fréquents traumatismes de l'épithélium de surface, fin et fragile.

D'autre part, l'analyse de Werness et al. [9] révélait en fait une modification importante : des anomalies nucléaires sous forme d'une irrégularité des contours, et surtout la présence d'une chromatine hétérogène, plus dense que les témoins. Deligdish [12] confirmait ces anomalies grâce à l'analyse morphométrique nucléaire : 77,6 % des ovaires de descendants juifs ashkénazes (connus pour la fréquence des mutations BRCA1) contenaient des anomalies nucléaires significatives (taille importante du noyau, distribution hétérogène de la chromatine).

La présence de dysplasie chez ces patientes à haut risque de cancer de l'ovaire représente ainsi l'opportunité de mieux appréhender la cancérogenèse ovarienne.

### 2.2. Dysplasie controlatérale à un cancer de l'ovaire unilatéral

En se fondant sur le constat que le cancer de l'ovaire est volontiers bilatéral (plus de 50 % des cas), Mittal et al. [13] ont recherché des lésions précancéreuses sur l'ovaire controlatéral à un carcinome ovarien unilatéral : la fréquence des kystes d'inclusion est plus élevée, avec davantage de métaplasie Müllérienne (OR = 10, IC95 % = 1,2–78,1). De la même façon, Resta et al. [14] mettait en évidence un taux significatif d'anomalies architecturales au niveau des ovaires controlatéraux à un carcinome ovarien unilatéral, sous forme d'hyperplasie épithéliale avec métaplasie müllérienne localisée sur l'épithélium de surface ou au niveau de kystes d'inclusion.



(92 % des cas), une papillomatose de surface, une hyperplasie stromale et des psammomes.

Ces différentes anomalies étaient également regroupées sous le terme générique de dysplasie.

### 2.3. Dysplasie adjacente à un cancer de l'ovaire

Les analyses microscopiques et cytométriques rapportaient des modifications architecturales cellulaires et nucléaires équivalentes au niveau de l'épithélium de surface non malin ou de kystes d'inclusion adjacents à un cancer de l'ovaire [15] : l'association d'atypies nucléaires (pléiomorphisme nucléaire, distribution irrégulière de la chromatine) à des atypies cellulaires (pseudostratification épithéliale, perte de polarité) posait le diagnostic de néoplasie intraépithéliale ovarienne (dysplasie sévère) avec une sensibilité de 98 % et une spécificité de 100 %.

### 2.4. Dysplasie et induction de l'ovulation

Les deux facteurs de risque de néoplasie ovarienne les plus fréquemment évoqués sont la prédisposition héréditaire et « l'ovulation incessante » (Fathalla) [16], avec, dans ce dernier cas, l'implication éventuelle de l'hyperstimulation ovarienne. Dans la mesure où l'étude histopathologique des pièces d'ovariectomies prophylactiques réalisées pour prédisposition génétique a montré des anomalies fréquentes évocatrices de dysplasie ovarienne précurseur du cancer, certains auteurs ont eu l'idée de rechercher si des lésions similaires pouvaient être retrouvées sur des pièces d'ovariectomie réalisées après hyperstimulation ovarienne dans le cadre du traitement de la stérilité.

Une première étude [17] a retrouvé des stigmates de dysplasie ovarienne sur des ovaires stimulés significativement par rapport à une population témoin (sans facteur de risque de néoplasie gynécologique et spontanément fertile) et à une population de patientes nullipares. L'expérimentation animale a confirmé ces premiers éléments en mettant en plus en évidence un effet-dose, autrement dit : la dysplasie est d'autant plus fréquente et sévère que l'intensité de la stimulation est importante [18,19].

Nous avons récemment rapporté les mêmes conclusions : présence de dysplasie sur une série d'ovaires stimulés, mise en évidence d'un effet dose, et mise en évidence d'un effet original non décrit jusqu'à présent, l'effet temps : sur notre série, d'une part la dysplasie ovarienne est d'autant plus sévère qu'il y a de cycles d'ovulation et d'autre part, elle apparaît significativement après un délai de plusieurs années (sept années) et n'aurait pas tendance à régresser, sans pour autant que l'on puisse prédire l'évolution à long terme [20] (Fig. 1).

## 3. Scores de dysplasie

La dysplasie ovarienne peut être définie par des critères cytologiques et architecturaux, morphométriques ou bien encore basée sur l'analyse caryométrique.

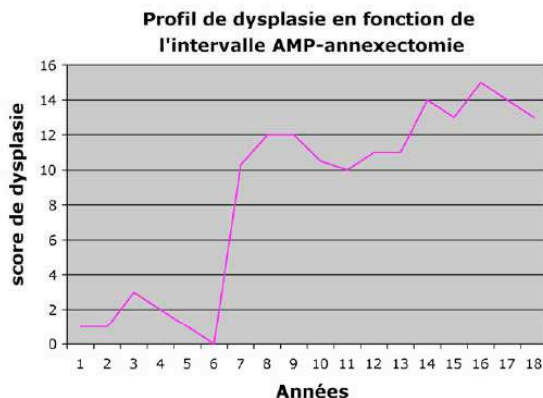


Fig. 1. Dysplasie en fonction de l'intervalle AMP/annexectomie [20].

### 3.1. Score histopathologique

Les modifications histopathologiques caractéristiques de dysplasie sont difficiles à déterminer : il s'agit d'anomalies cytologiques et architecturales subtiles, fondées sur une évaluation subjective – et l'expérience dans ce domaine – de l'anatomopathologiste. Plusieurs scores ont été décrits.

#### 3.1.1. Score de Salazar et al. [8]

Il est fondé sur la présence d'au moins trois des critères suivants : kystes d'inclusion, pseudostratification épithéliale, papillomatose de surface, invaginations profondes, hyperplasie stromale. La sensibilité serait de 75 %, la spécificité de 90 %. La sensibilité augmente à 85 % si l'on considère seulement deux critères. Ce score a le mérite d'être simple et reproductible mais il est incomplet et ne fait pas état de la sévérité de chacune des anomalies.

#### 3.1.2. Score de Plaxe et al. [15]

Ce score considère comme nécessaire et suffisant la présence des quatre critères suivants pour affirmer le diagnostic de néoplasie intraépithéliale (OIN) de l'ovaire avec une sensibilité de 98 % et une spécificité de 100 % : perte de polarité, stratification épithéliale, pléiomorphisme cellulaire, distribution irrégulière de la chromatine. Cependant, limiter les atypies cellulaires et nucléaires à deux critères seulement semble restrictif et insuffisant pour parler de néoplasie intraépithéliale.

#### 3.1.3. Score de Nieto et al. [17]

Celui-ci a l'avantage d'être à la fois quantitatif (fondé sur neuf critères cytologiques et nucléaires) et qualitatif (fondé sur deux niveaux de sévérité).

Nos précédentes études [21,22] ont repris et amélioré le score établi par Nieto et al., en ajoutant les items validés par Salazar et al. afin d'obtenir un score exhaustif et reproductible.

### 3.2. Score morphométrique [22–24]

Un des inconvénients majeurs du score histopathologique réside dans la subjectivité de la détermination de ce score : les

anomalies sont difficiles à identifier puisque aucun critère ou score n'est unanimement reconnu (contrairement à la dysplasie cervicale).

L'analyse morphométrique a été initialement utilisée pour l'étude des cancers invasifs et les tumeurs borderlines de l'ovaire [22]. Elle a ensuite été adaptée par l'équipe de Deligdisch [23,24] pour l'évaluation de la dysplasie ovarienne : elle détermine le degré de stratification et la perte de polarité (par la mesure de la plus courte distance entre le noyau et la membrane basale, la densité cellulaire), et le pléiomorphisme nucléaire (par la mesure du périmètre et de la surface nucléaire). Le couplage informatique permet d'obtenir une analyse objective.

Deligdisch a ainsi comparé trois groupes : 13 cancers de l'ovaire, 13 transitions entre l'épithélium d'allure bénigne et les zones malignes au sein du groupe précédent, et huit témoins. L'analyse morphométrique retrouve des différences significatives entre les trois groupes. Son étude conclut cependant à l'importance de l'analyse histopathologique première : en effet, la morphométrie n'est pas complètement objective car elle repose tout d'abord sur l'évaluation histopathologique première, et, deuxièmement, elle ne permet pas pour l'instant de mieux évaluer la dysplasie.

### 3.3. Score fondé sur le profil nucléaire : la caryométrie nucléaire [25,26]

Partant du fait que l'aspect et les modifications de la chromatine nucléaire sont un reflet de l'activité cellulaire, Deligdisch et al. [25] ont proposé une analyse quantitative de la texture ou profil nucléaire, encore dénommée caryométrie nucléaire par Brewer et al. [26]. Les conclusions de Deligdisch et Brewer sont identiques, en réussissant à distinguer l'ovaire normal, dysplasique, et cancéreux. Cependant, il s'agit d'une technique de recherche qui repose également sur l'évaluation histopathologique première de la chromatine nucléaire.

### 3.4. Profil immunohistochimique des tissus ovariens dysplasiques [27,28]

Les études immunopathologiques des marqueurs tumoraux ont mis en évidence une augmentation de l'expression du marqueur de prolifération Ki-67, du p53 et de l'antigène CA 125 au niveau des ovaires à risque génétique de cancer, (en particuliers au niveau de l'épithélium des kystes d'inclusion et des invaginations profondes). D'une part, ces profils immunohistochimiques sont un argument supplémentaire pour confirmer l'existence de la dysplasie. D'autre part, cette immunoréactivité commune aux lésions dysplasiques et cancéreuses, ainsi que la présence de lésions dysplasiques à proximité des cancers invasifs pourraient suggérer une continuité lésionnelle.

## 4. Signification et évolutivité de la dysplasie

Peut-on superposer l'histoire naturelle du cancer de l'ovaire à, par exemple, l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus,

Tableau 1  
Caractéristiques concernant l'épithélium bénin et la zone de transition

	Épithélium d'allure bénigne (%)	Transition dysplasique (%)
Carcinomes mucineux	74 [28] 90 [29]	26 [28]
Carcinomes séreux	15 [28] 56 [29]	8 [28] 28 [29]
Carcinomes séreux mixtes	31 [28]	18 [28]
Carcinomes endométrioïdes	46 [28]	80 [28]
Carcinomes à cellules claires	39 [28]	52 [28]

Étude de Scully [30] (189 cancers épithéliaux de l'ovaire) ; Étude de Puls [31] (70 cancers épithéliaux de l'ovaire).

à savoir, la séquence suivante : une évolution progressive de l'épithélium bénin vers un épithélium présentant des atypies et de la dysplasie, pour finalement aboutir au cancer ? Autrement dit, la dysplasie ovarienne est-elle synonyme de lésions précurseurs du cancer ?

### 4.1. Dysplasie adjacente à un cancer de l'ovaire et dysplasie controlatérale à un cancer de l'ovaire unilatéral

Plusieurs études [29–32] retrouvent des zones de transition dysplasiques entre l'épithélium d'allure bénigne au contact et au sein de carcinomes ovariens (Tableau 1). Il ne fait pas de doute qu'il s'agit bel et bien de lésions précancéreuses.

De même, le cancer de l'ovaire étant volontiers bilatéral, il paraît logique de considérer la dysplasie controlatérale à un cancer de l'ovaire unilatéral comme une lésion précancéreuse, ce que corrobore plusieurs travaux [13,33].

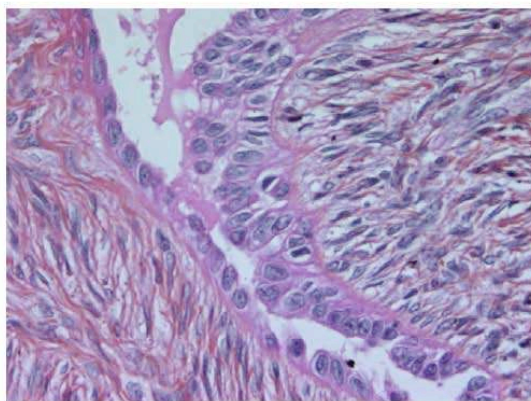
### 4.2. Dysplasie et risque génétique (BRCA1/2)

Les caractéristiques histopathologiques et morphométriques de la dysplasie concernant des ovaires à risque génétique (mutation BRCA1/2) sont similaires à la dysplasie adjacente à un cancer de l'ovaire mais aussi à la dysplasie controlatérale à un cancer de l'ovaire [13–15,25,34], reflétant probablement un processus pathologique équivalent : la dysplasie serait donc une lésion préinvasive (Fig. 2 à 4) : les kystes d'inclusion se formeraient soit lors du processus de cicatrisation de l'ovulation par agrégation des cellules épithéliales de surface, soit suite aux invaginations corticales profondes (recouvertes par les cellules épithéliales de surface) après plusieurs cycles d'ovulation. Soumis à un stroma hyperactif (sous l'influence paracrine hormonal, et sous l'action de facteurs de croissances, de cytokines, de mitogènes et de mutagènes), surviendraient ensuite des phénomènes de métaplasie, puis de dysplasie au niveau de ces kystes, générant à terme des cancers de l'ovaire [35,36].

### 4.3. Dysplasie et induction de l'ovulation

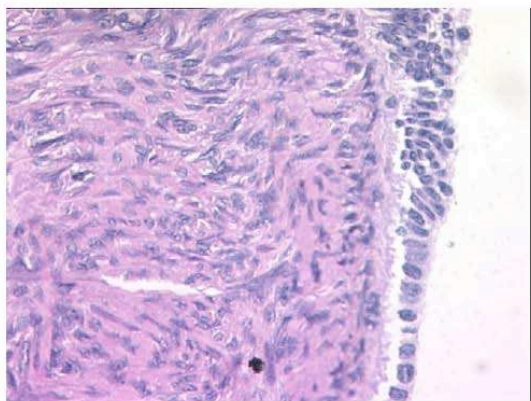
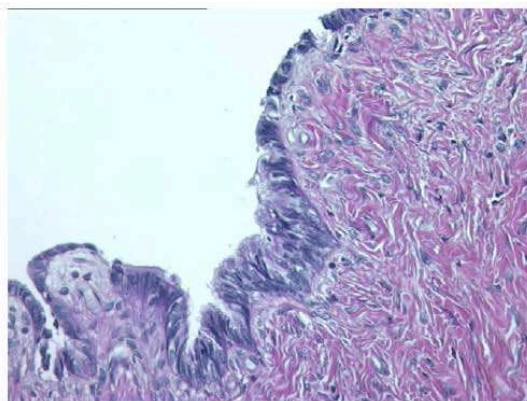
S'il semble admis que la dysplasie ovarienne est une lésion précancéreuse chez les sujets à risque génétique de cancer de l'ovaire (mutation BRCA1 ou 2), que penser de la dysplasie



Fig. 2. Anisocaryose, HES  $\times 40$ .

retrouvée chez certaines patientes ayant bénéficié de stimulation de l'ovulation ?

Tout d'abord, les études traitant de ce sujet peuvent être qualifiées d'observationnelles : les séries publiées [17–20] concernent de faibles cohortes et présentent des lésions de dysplasie, sans préjuger de leur évolution. Deuxièmement, le profil de dysplasie semble différent entre ovaires stimulés (Assistance médicale à la procréation, [AMP]) et ovaires à risque génétique : ainsi, la prolifération épithéliale, les kystes d'inclusion, les psammomes, les invaginations épithéliales profondes et l'hyperplasie stromale sont plus fréquents et sévères pour les ovaires à risque génétique. En revanche, le pléiomorphisme cellulaire et l'augmentation du ratio nucléocytoplasmique sont plus fréquents pour le groupe des ovaires stimulés (Fig. 2 à 5). Ces éléments pourraient expliquer en partie leur évolution différente : devant l'association significative retrouvée par plusieurs travaux entre induction de l'ovulation et tumeurs borderlines de l'ovaire [37–41], la dysplasie après hyperstimulation constituerait un argument supplémentaire pour corroborer cette association, alors que la dysplasie des ovaires à risque génétique prédisposerait plutôt

Fig. 3. Pléiomorphisme cellulaire, HES  $\times 40$ .Fig. 4. Prolifération épithéliale, HES  $\times 20$ .

aux cancers invasifs. Pour autant, les antécédents d'infertilité étant assez fréquents chez les patientes présentant des carcinomes ovariens, l'association stimulation de l'ovulation/carcinogénèse ovarienne pourrait plutôt correspondre à une coïncidence qu'à un véritable rapport de cause à effet.

## 5. Recommandations pratiques

### 5.1. Surveillance et dépistage

L'échographie endovaginale n'est pas adaptée dans le dépistage de lésions dysplasiques et son utilisation dans le dépistage des cancers débutants reste décevante, car même si ce test est très sensible, sa spécificité et sa valeur prédictive positive restent insuffisantes, conduisant à un trop grand nombre d'explorations chirurgicales pour diagnostiquer un cancer de l'ovaire au stade précoce [42–44].

La fiabilité du marqueur CA 125 [2,3] est décevante en prévention primaire : 50 à 60 % seulement des cancers de l'ovaire stade I ont un CA 125 élevé, avec une valeur prédictive positive de 10 %. Par ailleurs, il n'est pas adapté au dépistage

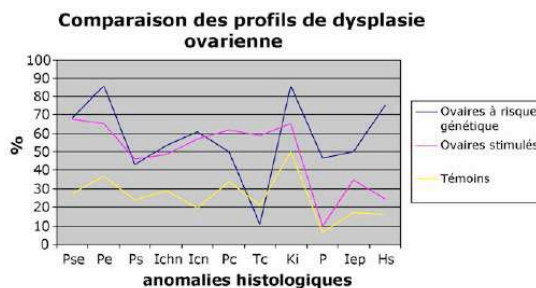


Fig. 5. Comparaison des profils de dysplasie ovarienne. Pse : pseudostratification épithéliale ; Pe : prolifération épithéliale ; Ps : papillomatose de surface ; Ichn : irrégularité de la chromatine nucléaire ; Icn : irrégularité du contour nucléaire ; Pc : pléiomorphisme cellulaire ; Tc : taille nucléaire (augmentée ou non) ; Ki : kystes d'inclusion ; P : psammomes ; Iep : invaginations épithéliales profondes ; Hs : hyperplasie stromale.

des lésions dysplasiques et n'est pas spécifique de l'ovaire (il est ainsi augmenté pendant la grossesse, en cas d'endométriose, voire même en cas de pleurésie non carcinomateuse, de péricardite, de cancer du colon et du pancréas).

D'autres auteurs ont décrit un algorithme du CA 125 couplé à l'échographie : Cohen et al. ont proposé une stratégie associant échographie et CA125, ce qui augmente la valeur prédictive positive à 20 % [45]. Par la suite, les travaux de I. Jacobs et al. [46–48] ont retrouvé une spécificité de 99,9 % et une sensibilité plus faible de 71 % en cas de dosage répété du CA 125 sur cinq ans permettant d'obtenir un profil individuel pertinent du CA 125. Cela a conduit au développement de l'algorithme de risque de cancer de l'ovaire (ROCA) : cet algorithme est fondé sur le théorème de Bayes, et compare le profil individuel du CA 125 obtenu par suivi longitudinal à des profils types de CA 125 correspondant à des cas de cancer de l'ovaire. Plus les profils sont comparables, plus le risque de cancer est augmenté. Le résultat est présenté sous forme d'un risque individuel estimé de cancer de l'ovaire dans l'année suivant la procédure. La sensibilité du ROCA pour les stades précoces est de 60 % contre 40 % en pratique clinique. Les patientes ayant un ROCA intermédiaire auront à nouveau une surveillance par CA 125 ; ceux avec un risque élevé, une échographie endovaginale. La spécificité de cette stratégie de dépistage s'élève à 99,8 %, et la valeur prédictive positive à 19 %.

Le profil protéique décrit par Petricoin et al. [49,50] offre, pour les stades débutants I, une sensibilité de 100 % (95 % IC = 93–100) et une spécificité de 95 % (95 % IC = 87–99). La valeur prédictive positive s'élevait à 94 % (95 % IC = 84–99) contre 35 % pour le CA125 des mêmes cas. Cette technique est originale et pourrait apporter des réponses concernant la cancérogenèse ovarienne car les types et concentrations en protéines reflètent probablement les différents stades de la maladie et pourquoi pas les états dysplasiques. Le profil protéique est toujours en cours d'élaboration et pourrait à terme intéresser le dépistage des populations à risque de néoplasie ovarienne.

## 5.2. Méthodes invasives

Graham et Graham R-M [51] ont proposé le diagnostic de dysplasie ovarienne par culdocentèse. Cependant, les résultats de sa série de six patientes ont été récemment réanalysés par Werness et Eltabakh [52] en 2000 : les lésions étiquetées dysplasie ovarienne s'apparentent après relecture à des variants de la normale. Si cette technique a l'avantage d'une faible morbidité, il reste à démontrer son intérêt sur de plus grandes séries.

La cytologie péritonéale constitue le premier temps opératoire de l'annexectomie/kystectomie ovarienne. Soit on peut directement prélever le liquide péritonéal, s'il est assez abondant ; soit on réalise un lavage au sérum physiologique de la cavité pelvienne, des gouttières pariétocoliques et de la cavité abdominale. Sa positivité permet un restaging en sous-classe c et permet d'adapter dans ce cas le traitement et la surveillance. Deux études ont estimé la valeur de la cytologie

péritonéale dans le diagnostic de dysplasie ovarienne dans le cadre d'ovariectomies prophylactiques [53,54]. Paley et al., en 2001 [54], retrouvaient quatre lavages positifs sur cinq carcinomes occultes découverts à l'examen histopathologique. Colgan et al., en 2002 [53] retrouvaient dans sa série de 35 patientes trois lavages positifs. Seulement deux carcinomes occultes étaient mis en évidence à l'examen histopathologique définitif. Le problème du lavage péritonéal réside en fait dans sa faible sensibilité : il n'est pas rare que la cytologie soit négative en présence d'une volumineuse tumeur de l'ovaire, probablement du fait d'une mauvaise exfoliation des cellules malignes. De là à mettre en évidence des cancers occultes, voire de la dysplasie... Cependant, Colgan et al. ont mis en évidence un élément très intéressant : l'endosalpingiose. Ce n'est pas un précurseur néoplasique mais une anomalie métaplasique mésothéliale qui est significativement augmentée dans les tumeurs borderlines séreuses [55]. La prévalence de cette endosalpingiose concernait sept ovaires (22 %) qui étaient dysplasiques à l'histologie. Dans l'avenir, l'étude de la cytologie péritonéale pourrait peut-être amener à la mise en évidence de facteurs ou marqueurs spécifiques de la dysplasie. Colgan et al. concluaient que, après le cancer ovarien et le cancer endométrial, l'ovariectomie prophylactique représente la troisième indication gynécologique de cytologie péritonéale.

Depuis la conférence de consensus de Bethesda de 1994, la réalisation d'une annexectomie prophylactique a été recommandée après l'âge de 35 ans ou après réalisation du projet familial [6], chez les patientes aux antécédents familiaux de cancer du sein et/ou de l'ovaire et/ou porteuses de la mutation BRCA1 et 2. La technique de référence fait appel à la cœliochirurgie qui offre les avantages reconnus d'une faible morbidité, d'une inspection complète et précise de la cavité abdominopelvienne, et d'éventuelles biopsies dirigées. Cette chirurgie prophylactique a été évaluée par plusieurs auteurs : Rebbeck [56,57] rapportent 96 % de réduction du risque de cancer mésothélial et péritonéal (série de 259 ovariectomies prophylactiques avec un suivi moyen de neuf ans, RR = 0,04, 95 % IC = 0,01–0,16), et 53 % pour le cancer du sein. Kauff et al. [58] confirment l'effet protecteur avec un risque relatif de 0,21 (série de 170 ovariectomies prophylactiques avec un suivi moyen de 24,2 mois, RR = 0,21, 95 % IC = 0,07–0,62). Cependant, pour certains, l'efficacité de cette intervention est certes significative mais incomplète [59], car de rares cas de carcinomes intrapéritonéaux se sont développés entre une à 27 années après l'ovariectomie prophylactique [59,60]. L'origine de ces carcinomes péritonéaux n'est pas clairement identifiée [4] :

- origine péritonéale primitive en raison de l'origine embryologique coélomique identique à l'ovaire et soumis au même risque génétique ?
- origine ovarienne : tissu ovarien ectopique ? Ovariectomie incomplète avec persistance de tissu ovarien ? Récurrence d'un cancer ovarien occulte non diagnostiqué ?
- origine tubaire ?

Ce dernier point mérite d'ailleurs quelques précisions : les patientes porteuses de la mutation génétique BRCA sont



également à risque de développer des cancers de la trompe. Brose et al. [61] retrouvent un risque de 3 %, alors qu'il n'est que de 0,025 % dans la population générale (soit un risque multiplié par 120). Ainsi, cette chirurgie prophylactique doit intéresser aussi bien les ovaires que les trompes et le péritoine adjacent et consistera finalement en une annexectomie bilatérale. Pourtant, des carcinomes péritonéaux se sont développées après annexectomies bilatérales, probablement sur fragment tubaire persistant au niveau des cornes utérines [62]. Faudrait-il réaliser des hystérectomies avec annexectomies bilatérales prophylactiques ? Oui, dans les syndromes de Lynch II où il existe un risque génétique de cancer de l'endomètre. En revanche, dans les autres cas, l'indication d'hystérectomie est à discuter : l'hystérectomie préviendrait le cancer de l'endomètre, si la patiente présente un jour un cancer du sein traité par tamoxifène. De plus, dans l'une des plus grandes séries comportant 324 annexectomies prophylactiques [62], les six cas de carcinomes péritonéaux intéressaient des patientes ayant eu une hystérectomie concomitante. Par ailleurs, la série d'Alvarado et al. [63] concernant 105 cas de cancers de la trompe retrouvait une localisation préférentielle au niveau du pavillon tubaire : cette constatation plaide donc pour une analyse histologique attentive des pièces d'annexectomie afin de diagnostiquer un cancer occulte débutant.

Pour conclure, Modugno [64] considère que si l'annexectomie bilatérale est actuellement la seule méthode efficace de prévention primaire du cancer de l'ovaire héréditaire, le risque persiste néanmoins : la formule anglo-saxonne *risk-reducing salpingo-oophorectomy* incite à la poursuite de la surveillance après annexectomie bilatérale.

Qu'en est-il des patientes ayant bénéficié d'une AMP avec induction de l'ovulation ? Faut-il proposer une coelioscopie avec biopsie ovarienne systématiquement au-delà de sept années après stimulation ovarienne ou à la ménopause ? Cela paraît un geste lourd alors que le risque est encore incertain et en tout cas difficile à chiffrer. Il nous semble néanmoins raisonnable de poursuivre une surveillance gynécologique des patientes suivies en AMP et d'être particulièrement vigilant devant l'apparition d'un kyste de l'ovaire.

## 6. Conclusion

La littérature n'apporte pas de preuve formelle que de telles anomalies histopathologiques dysplasiques soient une des premières étapes conduisant inexorablement à la malignité ou aux tumeurs borderlines. La cancérogenèse ovarienne est en effet un processus stochastique, multifactoriel et complexe dans lequel il n'y a pas nécessairement de transition d'un état dysplasique à un état cancéreux. Pourtant, il semble fondamental de distinguer le contexte clinique car l'évolutivité de la dysplasie n'est pas la même : s'il apparaît que la dysplasie soit à considérer comme une lésion à risque de cancer de l'ovaire chez les sujets porteurs de la mutation BRCA, sa signification et son évolutivité chez les patientes ayant bénéficié de stimulation de l'ovulation sont probablement différentes.

## Références

- [1] Remontet L, Buemi A, Velten M, Jouglu E, Estève J. Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. Inserm/Institut de veille sanitaire/Réseau français des registres de cancer. Éditions FRANCIM.
- [2] Dauplat J, Guastalla JP. Cancer de l'ovaire. Paris: Arnette Blackwell; 1996.
- [3] Brewer MA, Johnson K, Follen M, Gershenson D, Bast RJ. Prevention of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia. Clin Cancer Res Jan; 2003;9(1): 20–30.
- [4] Bewtra C, Watson P, Conway TA, Read-Hippee C, Lynch HT. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. Int J Gynecol Pathol 1992;11: 180–7.
- [5] Klaren HM, Veer LJ, Leeuwen FE, Rookus MA. Potential for bias on efficacy of prophylactic surgery for BRCA 1 and BRCA 2 mutation. J Natl Cancer Inst 2003;95:941–7.
- [6] National institutes of Health consensus development conference statement. Ovarian cancer: screening, treatment, follow-up. Gynecol oncol 1994; 55: 4–14.
- [7] Gusberg SB, Deligdisch L. Ovarian dysplasia, a study of identical twins. Cancer 1984;54:1–4.
- [8] Salazar H, Godwin AK, Daly MB, Laub PB, Hogan M, Rosenblum N, et al. Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies. J Natl Cancer Inst 1996;88:1810/20.
- [9] Werness BA, Afify AM, Bielak KL, Eltabbakh GH, Piver MS, Paterson JM. Altered surface and cyst epithelium of ovaries removed prophylactically from women with a family history of ovarian cancer. Hum Pathol 1999;30:151–7. 6.
- [10] Stratton JF, Buckley CH, Lowe D, Ponder BAJ. Comparison of prophylactic oophorectomy specimens from carriers and non-carriers of a BRCA1 or BRCA2 gene mutation. J Natl Cancer Inst 1999;91(7): 626–8.
- [11] Barakat RR, Federici MG, Saigo PE, Robson ME, Offit K, Boyd J. Absence of premalignant histologic, molecular, or cell biologic alterations in prophylactic oophorectomy specimen from BRCA1 heterozygotes. Cancer 2000;89:383–90.
- [12] Deligdisch L, Gil J, Kerner H, Wu HS, Beck D, Gershoni-Baruch R. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. Cancer 1999;86:1544–50.
- [13] Mittal KR, Jacquotte AZ, Cooper JL, Demopoulos R. Contralateral ovary in unilateral ovarian carcinoma: a search for preneoplastic lesions. Int J Gynecol Pathol 1993;12:59–63.
- [14] Resta L, Russo S, Colucci GA, Prat J. Morphologic precursors of ovarian epithelial tumors. Obstet Gynecol 1993;82:181–6.
- [15] Plaxe S, Deligdisch L, Dottino P, Cohen C. Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma. Gynecol Oncol 1990;38:367–72.
- [16] Fathalla M. Incessant ovulation: a factor in ovarian neoplasia ? Lancet 1971;2:163.
- [17] Nieto JJ, Crow J, Sundaresan M, Constantinovici N, Perret CW, Mc Lean AN, et al. Ovarian epithelial dysplasia in relation to ovulation induction and nulliparity. Gynecol Oncol 2001;82:344–9.
- [18] Corakci A, Filiz S, Caliskan E, Dalcik C, Ozeren S, Dalcik H. The effects of ovulation induction on ovarian epithelium dysplasia scores and Ki67 expression: an experimental study on rats. Int J Gynecol Cancer 2005;15:866–71.
- [19] Celik C, Gerginc K, Aktan M, Acar A, Yaman ST, Gungor S, et al. Effects of ovulation induction on ovarian morphology: an animal study. Int J Gynecol Cancer 2004;14:600–6.
- [20] Chêne G, Penault-Llorca F, Le Bouëdec G, Mishellany F, Dauplat MM, Jaffaux P, Aublet-Cuvellier B, Pouly JL, Déchelotte P, Dauplat J (2008). Ovarian epithelial dysplasia after ovulation induction: Time and dose effect. Human reprod. In Press.
- [21] Chêne G, Penault-Llorca F, Le Bouëdec G, Mishellany F, Dauplat MM, Jaffaux P, Aublet-Cuvellier B, Pouly JL, Déchelotte P, Dauplat J (2008). Ovarian epithelial dysplasia and prophylactic oophorectomy for genetic risk. Int J Gynecol Cancer, In Press.

- [22] Baak JP, Wisse-Brekelmans EC, Langley FA, Talerma A, Delemarre JF. Morphometric data to FIGO stage and histological type and grade for prognosis of ovarian tumors. *J Clin Pathol* 1986;39:1340–6.
- [23] Deligdisch L, Gil J. Characterization of ovarian dysplasia by interactive morphometry. *Cancer* 1989;63:748–55.
- [24] Deligdisch L, Einstein AJ, Guera D, Gil J. Ovarian dysplasia in epithelial inclusion cysts. *Cancer* 1995;76:1027–34.
- [25] Deligdisch L, Miranda C, Barba J, Gil J. Ovarian dysplasia: nuclear texture analysis. *Cancer* 1993;72:3253–7.
- [26] Brewer MA, Ranger-Moore J, Baruche A, Alberts DS, Greene M, Thompson D, et al. Exploratory study of ovarian intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2):299–305.
- [27] Schlosshauer PW, Cohen CJ, Penault-Llorca F, Miranda CR, Bignon YJ, Dauplat J, Deligdisch L. Prophylactic oophorectomy. A morphologic and immunohistochemical study. *Cancer*.
- [28] Werness BA, Parvatiyar P, Ramus SJ, Whittemore AS, Garlinghouse Jones K, Oakley Girvan I, et al. Ovarian carcinoma in situ with germline BRCA1 mutation and loss of heterozygosity at BRCA1 and TP53. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1088–91.
- [29] Bell DA, Scully RE. Early de novo ovarian carcinoma. *Cancer* 1994;73:1859–64. 003; 98 (12): 2599–2606.
- [30] Scully RE. Early de novo ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian lesions. *Int J Gyn Obstet* 1995;(49 (suppl)):9–15.
- [31] Puls LE, Powell DE, De Priest PD. Transition from benign to malignant epithelium in mucinous and serous ovarian cystadenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 1992;47:37–53.
- [32] Hutson R, Ramsdale J, Wells M. p53 protein expression in putative precursor lesions of epithelial ovarian cancer. *Histopathology* Oct; 1995;27(4):367–71.
- [33] Tressera F, Grases PJ, Labastida R, Ubieda A. Histological features of the contralateral ovary in patients with unilateral ovarian cancer: a case control study. *Gynecol Oncol* 1998;71:437–41.
- [34] Scully RE. Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem* 1995;23:208–18.
- [35] Auersperg N, Ota T, Mitchell GWE. Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:691–703.
- [36] Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 2001;38:87–95.
- [37] Harris R, Whittemore AS, Itnyre J, the collaborative Ovarian cancer Group. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. *Am J Epidemiol* 1992;136:1204–11.
- [38] Mahdavi A, Pejovic T, Nezhat F. Induction of ovulation and ovarian cancer: a critical review of the literature. *Fertil Steril* 2006;85:819–26.
- [39] Ness RB, Cramer DW, Goodman MT. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* 2002;155:217–24.
- [40] Shushan A, Paltiel O, Iscovich J, Elchalal U, Peretz Y, Schenker JG. Human menopausal gonadotropin and risk of epithelial ovarian cancer. *Fertil Steril* 1996;65:13–8.
- [41] Parazzini F, Negri E, La Vecchia C, Moroni S, Polatti A, Chiaffarino F, et al. Treatment for infertility and risk of ovarian tumors of borderline malignancy. *Gynecol Oncol* 1998;68:226–8.
- [42] Parkes CA, Smith D, Wald NJ, Bourne TH. Feasibility study of a randomised trial of ovarian cancer screening among the general population. *J Med Screen* 1994;1:209–14.
- [43] Depriest PD, Van Nagell JR, Gallion HH, Shenson D, Hunter JE, Andrews SJ, et al. Ovarian cancer screening in asymptomatic postmenopausal women. *Gynecol Oncol* 1993;51:205–9.
- [44] Sassone AM, Timor-Tritsch IE, Artner A, Westhoff C, Warren WB. Transvaginal sonographic characterization of ovarian disease: evaluation of a new scoring system to predict ovarian malignancy. *Obstet Gynecol* 1991;78:70–3.
- [45] Cohen LS, Escobar PF, Scharm C, Glimco B, Fishman DA. Three-dimensional power Doppler ultrasound improves the diagnosis accuracy for ovarian cancer prediction. *Gynecol Oncol* 2001;82:40–8.
- [46] Menon U, Talaat A, Jeyarajah AR, Rosenthal AN, McDonald ND, Skates SJ, et al. Ultrasound assessment of ovarian cancer risk in postmenopausal women with CA125 elevation. *Br J Cancer* 1999;10:1644–7.
- [47] Jacobs IJ, Skates SJ, McDonald N, Menon U, Rosenthal AN, Oram DH. Creeneing for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet* 1999;353:1207–10.
- [48] Menon U, Skates SJ, Lewis S, Rosenthal AN, McDonald N, Jacobs IJ. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7919–26.
- [49] Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572–7.
- [50] Conrads TP, Fusaro VA, Ross S, Johann D, Hitt BA, Steiberg SM, et al. High-resolution serum proteomic features for ovarian cancer detection. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:163–78.
- [51] Graham JB, Graham RM. Cul-de-sac puncture in the diagnosis of early ovarian carcinoma. *J Obstet Gynaecol Br Commonw Jun; 1967;74(3): 371–8.*
- [52] Werness B, Eltabbakh G. Ovarian dysplasia identified by cul de sac aspiration: a reexamination of previously reported cases. Letters to the editors. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19(2):190–1.
- [53] Colgan TJ, Boerner SL, Murphy J, Cole D, Narod S, Rosen B. Peritoneal lavage cytology: an assessment of its value during prophylactic oophorectomy. *Gynecol Oncol* 2002;85:397–403.
- [54] Paley PJ, Swisher EM, Garcia RL, Agoff N, Greer BE, Peters KL, et al. Occult cancer of the fallopian tube in BRCA1 germline mutation carriers at prophylactic oophorectomy: a case for recommending hysterectomy at surgical prophylaxis. *Gynecol Oncol* 2001;80:176–80.
- [55] Copeland LJ, Silva EG, Gershenson DM. The significance of Mullerian inclusions found at second look laparotomy in patients with epithelial ovarian neoplasms. *Obstet Gynecol* 1988;71:763–70.
- [56] Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002;346:1616–22.
- [57] Rebbeck TR. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Eur J Cancer* 2002;38s:S15–7.
- [58] Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA 1 or BRCA 2 mutation. *N Engl J Med* 2002;346:1609–15.
- [59] Struwing JP, Watson P, Easton DF, Ponder BA, Lynch HT, Tucker MA. Prophylactic oophorectomy in inherited breast/ovarian cancer families. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1995;(17):33–5.
- [60] Piver MS, Jishi MF, Tsukada Y, Nava G. Primary peritoneal carcinoma after prophylactic oophorectomy in women with a family history of ovarian cancer: a report of the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry. *Cancer* 1993;71:2751–5.
- [61] Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA. Cancer risk estimates for BRCA 1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1365–72.
- [62] Paley PJ, Swisher EM, Garcia RL. Occult cancer of the fallopian tube in BRCA 1 germline mutation carriers at prophylactic oophorectomy: a case for recommending hysterectomy at surgical prophylaxis. *Gynecol Oncol* 2001;80:176–80.
- [63] Alvarado-Cabrero I, Young RH, Vamvaka EC, Scully RE. Carcinoma of the fallopian tube: a clinicopathological study of 105 cases with observations on staging and prognosis factors. *Gynecol Oncol* 1999;72:367–79.
- [64] Modugno F. Ovarian cancer and high risk women- implications for prevention, screening, and early detection. *Gynecol Oncol* 2003;91:15–31.

## **Article 2 :**

**Chene G**, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Dauplat MM, Mishellany F, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly JL, Dechelotte P, Dauplat J. Ovarian epithelial dysplasia and prophylactic oophorectomy for genetic risk. **Int J Gynecol Cancer**. 2009 ; 19(1) : 65-72 . IF= 2.1

Cet article décrit la dysplasie ovarienne d'origine génétique (mutations BRCA)

# Ovarian Epithelial Dysplasia and Prophylactic Oophorectomy for Genetic Risk

Gautier Chêne, MD,\* Frederique Penault-Llorca, MD,† Guillaume Le Bouëdec, MD,\*  
 Florence Mishellany, MD,‡ Marie-Melanie Dauplat, MD,‡ Patricia Jaffeux,§  
 Bruno Aublet-Cuvelier, MD,§ Jean Luc Pouly, MD,¶ Pierre Déchelotte, MD,‡  
 and Jacques Dauplat, MD\*

**Objective:** To make an accurate histopathological description of ovarian dysplasia in a population at genetic risk of ovarian cancer and devise an ovarian dysplasia score.

**Materials and Methods:** In this retrospective cohort study, 90 patients who had undergone bilateral oophorectomy or ovarian cystectomy between 1992 and 2005 and whose ovaries were reported as normal were divided into two groups: Group A comprising prophylactic oophorectomies for genetic predisposition (N = 28), and Group B or control group, fertile and non-cancerous (N = 62). Eleven epithelial cytological and architectural features were defined. Ovaries were analysed and reviewed by four pathologists blinded to clinical data. An ovarian dysplasia score was devised to quantify extent of ovarian epithelial abnormalities. The degrees of ovarian epithelial abnormalities (dysplasia scores) were compared between the two groups.

**Results:** Mean dysplasia score was significantly higher in Group A (prophylactic oophorectomies) than in Group B (control group) (9.67 vs. 4.19,  $P < 0.001$ ). In Group A, we observed a gradation in the severity of the dysplastic lesions between (i) proven BRCA mutations and prophylactic oophorectomies without mutations (11.26 vs. 8.1), and (ii) according to age (10.27 after age 50 years vs. 8.6 before age 50 years,  $P = 0.2962$ ).

**Conclusion:** These results suggest abnormalities in ovaries from high risk women. The ovarian dysplasia may be a pre-malignant, non-invasive histological lesion that could be an important step in early neoplasia.

**Key Words:** Ovarian dysplasia, Prophylactic oophorectomy, BRCA mutation, Ovary, Neoplasm

(*Int J Gynecol Cancer* 2009;19: 65–72)

Hereditary predisposition (represented by family antecedents and/or BRCA 1 or 2 mutations) is one of the most important risk factors for breast and ovarian cancer, concerning 5% to 10% of all ovarian cancers.<sup>1</sup> In particular, BRCA 1 and 2 genetic mutations are responsible for at least 75% of hereditary cancers of the ovary, with in this case an estimated individual risk at 10% to 40%.<sup>2–4</sup> These patients are therefore candidates for appropriate primary preventive care.

Since the 1994 Bethesda Consensus Conference, prophylactic adnexectomy has been recommended in this high-risk group (family antecedents of breast and/or ovarian cancer and/or carriers of BRCA 1 and 2 mutations) after age 35 years or when no further pregnancies are wanted.<sup>5</sup>

This policy soon allowed the study of excised ovarian material, the macroscopic appearance of which is most often normal. However, careful complete anatomopathological examination of the whole ovary can reveal fine cytological and architectural modifications termed “ovarian dysplasia” and sometimes true occult ovarian cancer is discovered.<sup>6,7</sup>

The objective of this study was to confirm and detail the histopathology of signs of “ovarian dysplasia” in a comparison of their frequency and degree in a population at genetic risk against a control population.

## MATERIALS AND METHODS

### Population

Out of a total of 5500 adnexectomies and/or ovarian cystectomies performed between January 1990 and December 2005, we selected 90 patients whom we divided into 2 groups.

- Group A. Bilateral prophylactic ovariectomies for proven genetic predisposition (mutation of the gene BRCA1 or BRCA 2) or family history. The group included 28 patients who had undergone prophylactic adnexectomy following the finding of a mutant BRCA 1 gene (13 patients) or BRCA 2 gene (2 patients), or because of a strong family history of ovarian and/or breast cancer (13 patients). We defined a positive familial history as follows: (1) at least 1 first-degree relative with ovarian cancer and at least 1 first- or second-degree with breast cancer and/or a personal history of breast cancer or (2) at least 2 first- or second-degree relatives with breast cancer with a personal history of breast cancer.
- Group B. Adnexectomies in a control group. First we took a spontaneously fertile population with no personal or family history of gynecological cancer (breast, ovary or endometrium), who had undergone an adnexectomy and/or cystectomy for a benign disorder and in whom histopathological examination indicated healthy ovaries. We then age-matched this cohort to Group A. To reduce the confounding and protective effect of oral

\*Department of Surgery, Centre Jean Perrin, rue Montalembert; †Department of Histopathology, Centre Jean Perrin, rue Montalembert; ‡Department of Histopathology, CHU Hotel-Dieu; §Department of Medical Information, CHU; and ¶Department of Obstetrics & Gynecology, CHU Polyclinique, Clermont-Ferrand, France.

Address correspondence and reprint requests to Chene Gautier, MD,

Department of Surgery, Centre Jean Perrin, rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France. E-mail: chenegaugier@yahoo.fr.

Copyright © 2009 by IGCS and ESGO

ISSN: 1048-891X

DOI: 10.1111/IGC.0b013e3181990127



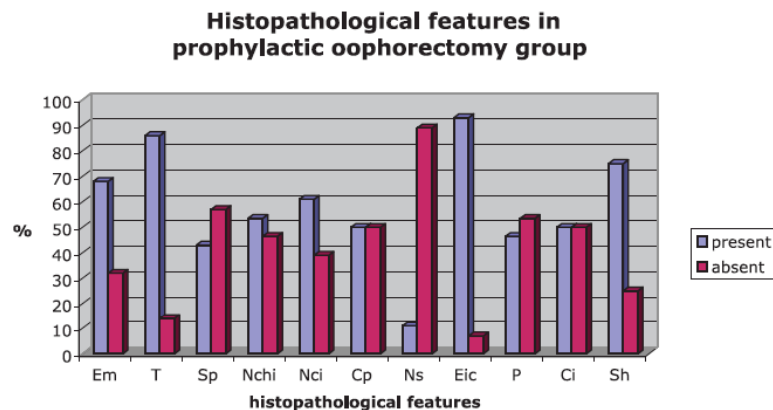


FIGURE 1. Histopathological features in prophylactic oophorectomy group.

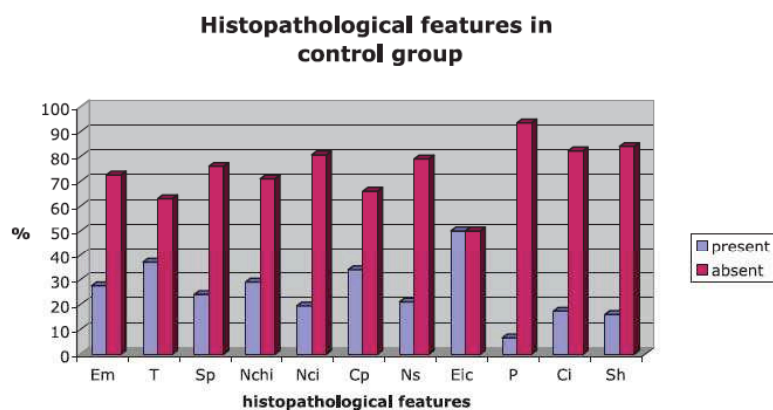


FIGURE 2. Histopathological features in control group. Em, epithelial multilayering; T, tufting; Sp, surface papillomatosis; Nchi, nuclear chromatin irregularity; Nci, nuclear contour irregularity; Cp, cellular pleomorphism; Ns, nuclear size; Eic, epithelial inclusion cysts; Ci, cortical invaginations; P, psammoma; Sh, stromal hyperplasia.

contraceptive use, we selected patients for whom the duration of oral contraceptive use was short. Finally, to obtain a better statistical power, we took 2 randomly selected controls for one at-risk patient. Our final control population comprised 62 patients.

### Histopathological Criteria

Our definition of ovarian atypia is based on earlier studies of ovarian dysplasia. In order for the method to be reproducible, we selected 11 histopathological criteria which are the following: (Figs. 3–12) epithelial multilayering, tufting, surface papillomatosis, nuclear chromatin irregularity, nuclear contour irregularity, cellular pleomorphism, nuclear size, epithelial inclusion cysts, cortical invaginations, psammoma, stromal hyperplasia (Figs. 1 and 2).

In each case, the most abnormal zone was scored from 0 to 2 (0, normal; 1, moderately abnormal; 2, severely abnormal).

A dysplasia score for each patient was simply obtained by summing the scores of all the 11 items (total range, 0–22).

The histopathological slides of the 28 prophylactic ovariectomies and the 62 controls were all read blind by 4 pathologists who were experts in oncogynecology. The average number of slides available for review from the 2 groups was 7.6 (5–11). When several

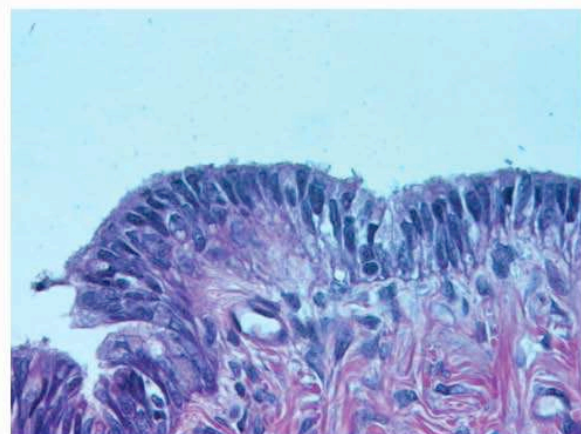


FIGURE 3. Photo 1: epithelial multilayering (hematoxylin and eosin stain (HES), ×40).

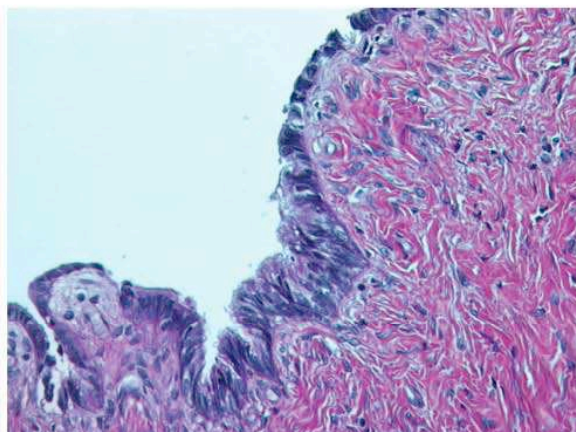


FIGURE 4. Photo 2: tufting (HES, ×20).

slides were available, the one with the highest dysplasia score was retained. If the pathologists' readings conflicted, then a new reading was made until a consensus was obtained.

### Statistical Analysis

Our main measurement was the dysplasia score, with the working hypothesis that the ovaries at genetic risk were associated with a higher dysplasia score than the control ovaries (which would normally have no dysplastic lesions).

Mean comparison of the dysplasia scores of Groups A and B was carried out with the Student *t* test. The 2 groups were already age-matched. As duration of contraceptive use and parity were quantitative variables, the statistical adjustment will not be taken into account.

### RESULTS

By definition, all group A had a family history of cancer; 82% had developed breast cancer at a very young age (44 years on average) with recurrence in 39% of cases. Personal and family history prompted screening for BRAC 1 or 2 gene mutations, which were found in 53.6% of cases (*n* = 15).

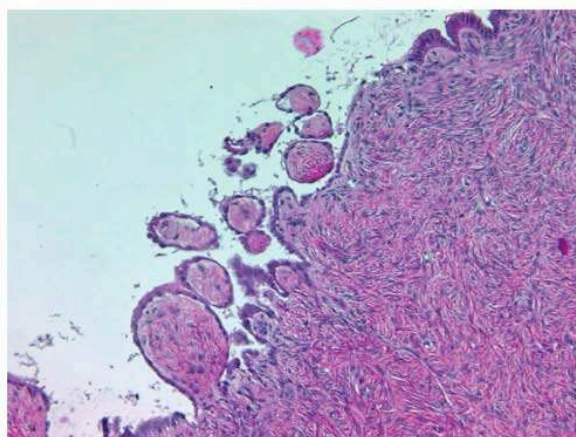


FIGURE 5. Photo 3: Surface papillomatosis (HES, ×10).

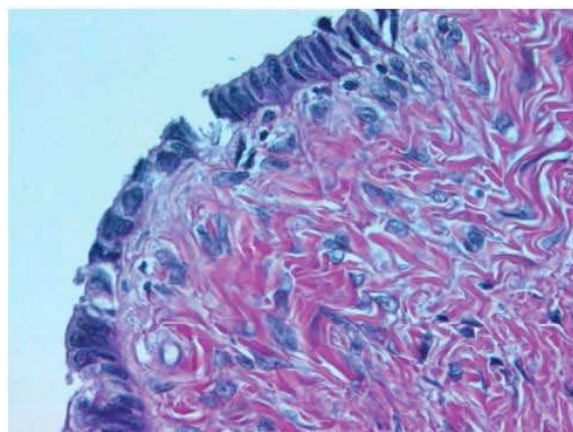


FIGURE 6. Photo 4: nuclear chromatin irregularity and nuclear contour irregularity (HES, ×40).

The data concerning parity, duration of use of oral contraceptives, age, and the different types of cancer of each patient when adnexectomy was performed are given in Table 1.

Histopathological analysis found no cancerous tumor in either group (Table 2). We note, however, 1 borderline tumor revealed by histopathology in group A.

The most representative anomalies in group A were epithelial inclusion cysts (100%), tufting (86%), stromal hyperplasia (75%) and epithelial multilayering (68%) (Fig. 1 and Table 3). Conversely, in group B, there were mostly no histopathological anomalies, except for epithelial inclusion kysts, which were present in half the cases (Fig. 2 and Table 3).

Close examination of group A revealed 2 subgroups: carriers of the BRCA mutation (15 patients) and family antecedents without mutation (13 patients): surface papillomatosis, nuclear chromatin irregularity and nuclear contour irregularity, cellular pleomorphism, and cortical invaginations were more frequent with the BRCA gene mutations. The anomalies were generally more marked in the ovaries carrying BRCA mutations. Epithelial inclusion cysts were present in 100% of cases, whether or not mutations were present (Table 3).

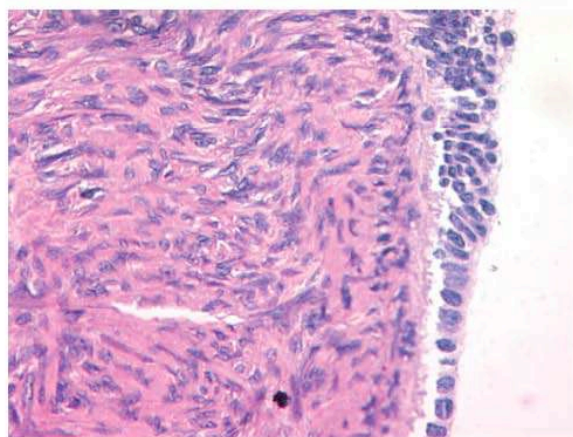


FIGURE 7. Photo 5: cellular pleomorphism (HES, ×40).



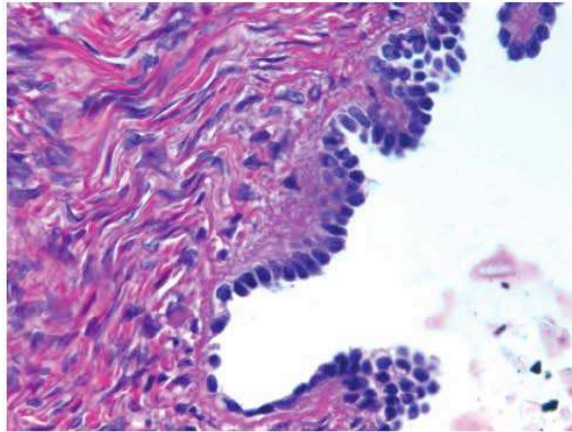


FIGURE 8. Photo 6: different and increased nuclear size (HES,  $\times 40$ ).

From these data, a mean dysplasia score was calculated for group A (prophylactic ovariectomies) by averaging the score of each ovariectomy patient. The mean dysplasia score for the prophylactic ovariectomy patients was 9.67.

In the same way, the mean dysplasia score of group B (controls) was 3.62 (Table 4).

The mean dysplasia score was significantly higher in the prophylactic ovariectomy population than in the control group (9.67 vs 3.62;  $P < 0.0001$ ). The distinction between BRCA mutation and antecedents with no mutation was apparent in a more severe dysplasia profile for BRCA mutation. Carriers of the genetic mutation had a significantly higher dysplasia score than patients with family antecedents (11.26 vs 8.1;  $P < 0.0039$ ), despite the fact that in our series, carriers of the genetic mutation made almost 9 times more use of oral contraceptives, which have a protective effect (133 months vs 15 months, respectively;  $P < 0.0003$ ; Table 5).

Lastly, we note that the mean dysplasia score was somewhat higher for age over 50 years (10.27 vs 8.6; NS; Table 6).

### DISCUSSION

In 1971, Fathalla<sup>8</sup> deduced from the higher frequency of ovarian cancer in nulliparous women that ovulation might be

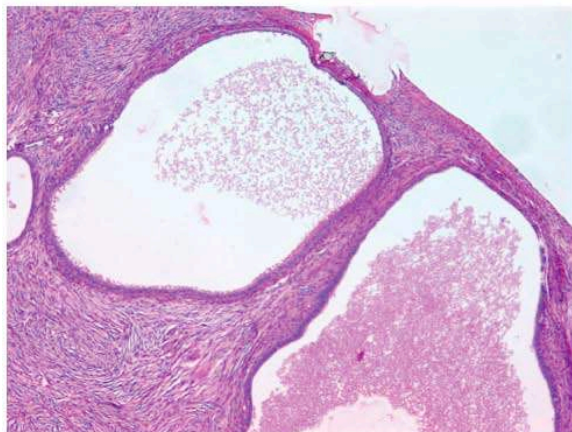


FIGURE 9. Photo 7: epithelial inclusion cysts (HES,  $\times 5$ ).

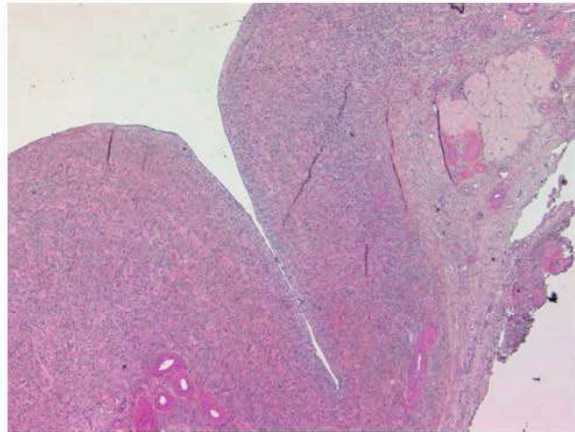


FIGURE 10. Photo 8: cortical invagination (HES,  $\times 5$ ).

implicated in the malignant modification of the ovarian epithelium. One of the physiopathological explanations would be that inclusion cysts (in our study, 100% in group A vs 50% in group B) could result from a natural and physiological process of regeneration after each ovulation, ie, invagination of the epithelial surface cells (in our study, 60% in BRCA mutation carriers vs 17.3% in group A) in the stroma. Because of stroma hyperplasia (in our study, 75% in BRCA mutation carriers vs 16% in group A), the entrapped epithelium could undergo this differentiation process: paracrine influence (hormonal influence through and gonadotrophins, and by the action of cytokines such as interleukins 1 and 6), influence of mitogens stimulating cell proliferation (IL 1 thereby induces the formation of TNF  $\alpha$ ), and influence of morphogens and/or mutagens of the ovarian cortex (stimulating mutations in surface epithelial cells).<sup>9-11</sup>

The first histopathological description of ovarian dysplasia was reported in the study of Gusberg and Deligdisch<sup>12</sup> in 1984. These authors studied the excised material from prophylactic adnexectomy in 3 women whose monozygotic twins had an invasive ovarian cancer.

In all 3 cases, the ovaries were macroscopically normal. However, microscopic analysis revealed various cytological and architectural anomalies: surface papillomatosis, epithelial inclusion

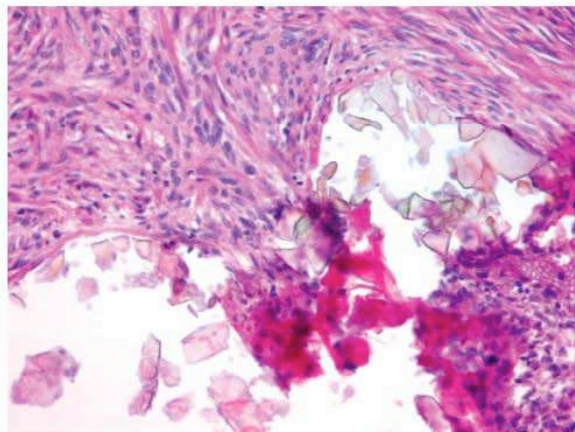


FIGURE 11. Photo 9: psammoma (HES,  $\times 20$ ).



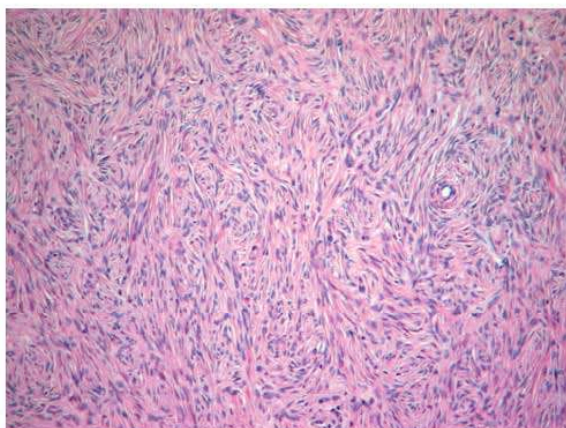


FIGURE 12. Photo 10: stromal hyperplasia (HES, ×10).

cysts, nuclear pleomorphism, epithelial multilayering, and epithelial invaginations.

By analogy with other precancerous lesions of the genital tract, the association of these different anomalies was then termed ovarian dysplasia or ovarian precancerous lesions.<sup>13–15</sup>

In 1996, Salazar et al<sup>16</sup> compared the ovaries of 20 high-risk patients with those of 20 patients with no family antecedents. They also found signs of dysplasia in the prophylactic adnexectomy material from high-risk patients: surface papillomatosis, epithelial

TABLE 1. Demographic characteristics of the prophylactic ovariectomy group (n = 28) and control group (n = 62)

Variables	Prophylactic ovariectomy, n = 28	Control group, n = 62
Age	46.5 y (37–62)	44.8 (40–51)
Parity	1.9 (1–4)	2.0 (1–4)
Oral contraceptive use	13 (46.5%)	44 (95%)
Duration of oral contraceptive use	90.1 months (0–240)	49.9 months (10–90)
BRCA 1 mutation	13 (46.4%)	0
BRCA 2 mutation	2 (7.2%)	0
No mutation found	13 (46.4%)	0
First personal cancers	23 i.e. 82%, mean age = 44 years	0
Breast	23 (82%)	
Other organs	0	
Breast cancer recurrence	9 (39%)	0
Interval between the 2 cancers	7.4 y (1–14)	
Occurrence of a second cancer	1 cancer of the endometrium 1 non-Hodgkin lymphoma	0
Family cancer antecedents	100%	0

TABLE 2. Histopathological features of ovaries with hereditary predisposition (N = 28) and controls (N = 62)

Histopathological features	Family antecedents		Controls n = 62
	BRCA 1 or 2 mutations n = 15	with no BRCA mutation, n = 13	
Hemorrhagic corpus luteum	2	0	17
Follicular cyst	3	3	9
Ovary with normal appearance and paratubal cyst	4	5	0
Serous cystadenoma	2	2	5
Mucinous cystadenoma	2	1	6
Borderline tumor	0	1*	0
Endometrioma	1	0	12
Fibrothecoma	0	1	5
Marked bilateral atrophy	1	0	0
Pyosalpinx	0	0	5
Adnexal torsion	0	0	3

\*This case was diagnosed as benign tumor at the operation but final was borderline tumor.

multilayering, epithelial inclusion cysts, epithelial invaginations, and stromal hyperplasia, together with 2 cases of occult microinvasive cancers. Although only 9 patients out of 20 had a proven BRCA1 mutation, Salazar et al's study suggested the existence of a precancerous lesion phenotype in both patients with mutation and in patients at high risk because of their family antecedents.

In 1999, Werness et al<sup>17</sup> found an isolated increase in the number of epithelial inclusion cysts in their study, carried out blind in 64 prophylactic adnexectomies from high-risk patients compared with 30 controls. In contrast with the study of Salazar et al, other anomalies, such as papillomatosis or stromal hyperplasia, were not found with a greater frequency.

However, even if we find objective evidence of cytological and architectural anomalies in the ovaries of patients at genetic risk, this does not necessarily mean that associations of these modifications have to be considered as dysplastic lesions. These anomalies may merely be unusual but harmless variants of the norm.<sup>18–20</sup> How can we be sure they are pathological?

(1) We need to compare ovaries from patients at risk with those from healthy control patients. In our study, the elevated dysplasia score for prophylactic ovariectomy material was statistically significant compared with controls (9.67 vs 3.62,  $P < 0.0001$ ). We can therefore assert that genetic risk in Group A is associated with histologic abnormalities of the ovary and that these abnormalities are probably the first step of carcinogenesis. These early changes in ovary could be considered as precancerous, ie, "dysplasia."

(2) We need a histopathological dysplasia score that is reproducible and consistent with the literature. There is no consensual dysplasia scoring scheme, the histopathological modifications characteristic of dysplasia being difficult to determine.

Salazar et al,<sup>16</sup> using prophylactic ovariectomy material, established an ovarian dysplasia score based on the presence of at

**TABLE 3.** Distribution of histopathological anomalies in the prophylactic ovariectomy group (n = 28) and controls (n = 62)

	Prophylactic ovariectomies	Controls
Epithelial multilayering	19 (68%) BRCA+: 80% BRCA -: 60%	17 (27.5%)
Tufting	24 (86%) BRCA+: 93% BRCA -: 80%	23 (37%)
Surface papillomatosis	12 (43%) BRCA+: 53% BRCA -: 30%	15 (24%)
Nuclear chromatin irregularity	15 (53.5%) BRCA+: 67% BRCA -: 30%	18 (29%)
Nuclear contour irregularity	17 (61%) BRCA+: 80% BRCA -: 30%	12 (19.4%)
Cellular pleomorphism	14 (50%) BRCA+: 60% BRCA -: 40%	21 (34%)
Increased nuclear size	30 (11%) BRCA+: 13% BRCA -: 0%	13 (21%)
Epithelial inclusion cysts	28 (100%) BRCA+: 100% BRCA -: 100%	31 (50%)
Psammoma	13 (46.5%) BRCA+: 47% BRCA -: 60%	4 (6.5%)
Cortical invaginations	14 (50%) BRCA+: 60% BRCA -: 30%	11 (17.3%)
Stromal hyperplasia	21 (75%) BRCA+: 80% BRCA -: 70%	10 (16%)

The distribution of histopathological anomalies in the subgroup of prophylactic ovariectomy cases carrying the BRCA mutation (n = 15) and in the subgroup of prophylactic ovariectomy cases with family antecedents (N = 13) are also presented.

least 3 of the following items: epithelial inclusion cysts, epithelial multilayering, surface papillomatosis, deep invaginations, and stromal hyperplasia. The score is claimed to have a sensitivity of 75% and a specificity of 90%. The sensitivity is increased by 85% if only 2 items are considered. This score offers the advantage of being simple and reproducible, but it is incomplete and does not allow for the severity of any of the anomalies.

Plaxe et al,<sup>21</sup> from a study of apparently healthy ovarian tissue adjacent to stage I ovarian cancers, considered as both necessary and sufficient the presence of the following 4 items for a sound diagnosis of ovarian intraepithelial neoplasia with a sensitivity of 98% and a specificity of 100%, loss of polarity, epithelial stratification, cellular pleomorphism, and irregular distribution of chromatin. Although

**TABLE 5.** Comparison of mean dysplasia scores between prophylactic adnexectomies in carriers of the mutation BRCA 1 or 2 and patients with antecedents and no detected mutation

Dysplasia Score	Prophylactic adnexectomies BRCA 1 or 2	Prophylactic adnexectomies with antecedents	P
Mean dysplasia score	11.26	8.1	$P < 0.0399$
Mean age	46.5	49	NS
Mean parity	1.66	1.5	NS
Mean duration of oral contraceptive use	133 months	15 months	$P < 0.0003$

this score includes the study of nuclear atypia, it is still restrictive and may be biased by the presence of adjacent cancerous tissue.

By contrast, the score of Nieto et al,<sup>22</sup> based on a series of oophorectomies subjected to stimulation of ovulation, offers 3 advantages:

- It takes into account the severity of the anomalies by a complete analysis of excised material. The anomaly can be scored as absent (level 0), moderate (level 1), or severe (level 2). This analysis of the whole ovary is delicate as the modifications are very subtle.<sup>23</sup>
- It is more exhaustive, comprising a total of 9 cytological and architectural anomalies.
- It is underpinned by sound methodology. The score is based on the comparison of an exposed group with a control group with no ovarian neoplasia risk factors, in which it is highly probable that cytological anomalies will be either absent or rare. This statistical comparison with a control group is necessary because there is no threshold score for dysplasia.<sup>24</sup>

For our study, we adopted and extended the score devised by Nieto et al. We listed the cytological and architectural abnormalities that were most frequent and most representative of ovarian dysplasia after an exhaustive literature review (which also ensured excellent reproducibility and comparability for our study): ovarian dysplasia found in areas adjacent to stage I ovarian carcinoma,<sup>21,25</sup> in the contralateral ovary of women with stage I ovarian carcinoma,<sup>26,27</sup> in relation to ovulation induction,<sup>22</sup> and in prophylactic oophorectomy for BRCA mutation.<sup>16,18,19</sup> We incorporated all of these anomalies in order to have a complete dysplasia scoring system (Table 7).

(3) Moreover, the evidence of ovarian dysplasia distinct from cancerous and normal ovarian epithelium was demonstrated using morphometry and nuclear texture analysis.<sup>28,29</sup>

**TABLE 4.** Comparison of mean dysplasia scores between prophylactic adnexectomies and controls

Dysplasia score	Prophylactic adnexectomies	Control group	P
Mean dysplasia score	Group A: 9.67 BRCA mutations alone: 11.26 Antecedents alone: 8.1	4.19	$< 0.0001$ $< 0.0001$ $< 0.0001$

**TABLE 6.** Comparison of dysplasia scores in prophylactic adnexectomies by age

Dysplasia score	Prophylactic adnexectomies, age <50 y	Prophylactic adnexectomies, age >50 y	P
n	10	18	
Mean dysplasia score	8.6	10.27	NS, $P = 0.2962$

TABLE 7. Different scoring system of ovarian dysplasia

	Scoring system in prophylactic oophorectomy for genetic risk <sup>16,18,19</sup>	Scoring system in areas adjacent to stage 1 ovarian carcinoma <sup>21,25</sup>	Scoring system in the contralateral ovary of women with stage 1 ovarian carcinoma <sup>26,27</sup>	Scoring system in relation to ovulation induction <sup>1,22</sup>	Our Study
Epithelial multilayering	✓	✓	✓	✓	✓
Tufting				✓	✓
Nuclear atypia (including chromatin irregularity, loss of polarity)		✓	✓	✓	✓
Cellular pleomorphism		✓		✓	✓
Surface papillomatosis	✓		✓		✓
Epithelial inclusion cysts	✓		✓		✓
Psammoma	✓		✓		✓
Cortical invagination	✓		✓		✓
Stromal hyperplasia	✓		✓		✓

Finally, we also found that there was a gradation in the severity of dysplastic lesions. Carriers of the BRCA gene mutation had a significantly higher dysplasia score when there were family antecedents (11.26 vs 8.1;  $P < 0.0003$ ). Surface papillomatosis, nuclear atypia (nuclear chromatin irregularity and nuclear contour irregularity), cellular pleomorphism, and cortical invaginations seem to be characteristic of BRCA mutation.

Deligdisch et al<sup>30</sup> have found that 77.6% of ovaries obtained by prophylactic oophorectomy from women with a genetic predisposition had precancerous changes ("ovarian dysplasia") in the structure of their nuclei, as demonstrated by the morphologic study of nuclear area. Deligdisch et al concluded that "this finding strengthens the evidence there is indeed a high risk for the development of ovarian carcinoma in this group of patients." The increased susceptibility to ovarian cancer in the BRCA mutation carriers could be also in accord with the important nuclear atypia (in our study, 73.5% in the BRCA mutation carriers vs 30% in the nonmutation subgroup). This gradation shows that the dysplasia is more marked as the risk is higher, which suggests that the dysplasia is premalignant and that BRCA mutation carriers would have the more possibility of progressing to invasive cancer than nonmutation group. In addition, its greater occurrence in higher age groups suggests that it would be progressive (10.27 vs 8.6).

Moreover, there is a significant difference in the duration of the contraceptive use between the 2 groups. It is well known that the contraceptive use contributes to reduce the risk of ovarian cancer. Duration use of control group is twice as important as duration use in group A, the significance of high dysplasia score in group A is not diminished statistically. However, the duration is obviously long in group A, specially for the BRCA mutation carriers (133 months vs 15 months,  $P < 0.0003$ ). Although difference in dysplasia score between BRCA mutation carriers and noncarriers is statistically significant, it could be possible that there would be some influence in that group.

One of the limitation of our study is that we did not a histologic sampling of the fallopian tubes: based on the observations that many of the early carcinomas in the BRCA+ women arise in the distal fallopian tube,<sup>31,32</sup> there may be in fact more abnormalities than we report. Severe cytological atypia have been described as tufting, epithelial multilayering, and nuclear atypia.<sup>33,34</sup>

Systematic and careful examination of both the fimbria and the ovary in larger prospective study would be interesting to establish precisely presence and severity of dysplasia.<sup>35</sup>

## CONCLUSIONS

This study (worse dysplasia score between proven mutation and family antecedents alone and worse dysplasia score after age 50 years) suggests abnormalities in ovaries from high-risk women.

It also confirms the utility of systematic fine examination of excised material from prophylactic oophorectomy, which could be extended by molecular biology studies. It confirms the presence of fine cytological and architectural anomalies in at-risk ovaries. The gradation of these anomalies with risk level and with age suggests a progressive step that justifies using the term "ovarian dysplasia" to describe them.

## REFERENCES

1. Brewer MA, Johnson K, Follen M, et al. Prevention of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res*. 2003;9(1):20–30.
2. Bewtra C, Watson P, Conway TA, et al. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. *Int J Gynecol Pathol*. 1992;11:180–187.
3. Ford D, Easton DF, Bishop T, et al. Risk of cancer in BRCA 1 mutation carriers. *Lancet*. 1994;343:692–695.
4. Lynch HT, Bewtra C, Lynch JF. Familial ovarian carcinoma. *Am J Med*. 1986;81:1073–1076.
5. Piver MS, Wong C. Prophylactic oophorectomy: a century-long dilemma. *Hum Reprod*. 1997;12(2): 205–206.
6. Finch A, Shaw P, Rosen B, et al. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol Oncol*. 2006;100:58–64.
7. Schloosshauer PW, Cohen CJ, Penault-Llorca F, et al. Prophylactic oophorectomy. *Cancer*. 2003;98:2599–2606.
8. Fathalla M. Incessant ovulation: a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*. 1971;2:163–165.
9. Hamilton TC, Godwin AK, Ozols RF. Ovarian carcinogenesis. In *Ovarian Cancer*. Paris: Arnette Blackwell, 1996: 21–38.
10. Bershuck A, Kohler MF, Boente MP, et al. Growth regulation and transformation of ovarian epithelium. *Cancer*. 1993;71:545–551.
11. Wong AST, Auersperg N. Ovarian surface epithelium: family history and early events in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;70:1–8.
12. Gusberg SB, Deligdisch L. Ovarian dysplasia, a study of identical twins. *Cancer*. 1984;54:1–4.
13. Deligdisch L, Gil J, Kerner H, et al. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. *Cancer*. 1999;86:1544–1550.
14. Deligdisch L, Einstein AJ, Guera D, et al. Ovarian dysplasia in epithelial inclusion cysts. *Cancer*. 1995;76:1027–1034.



15. Deligdisch L. Ovarian dysplasia: a review. *Int J Gynecol Cancer*. 1997;7:89–94.
16. Salazar H, Godwin AK, Daly MB, et al. Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1810–1820.
17. Werness BA, Afify AM, Bielet KL, et al. Altered surface and cyst epithelium of ovaries removed prophylactically from women with a family history of ovarian cancer. *Hum Pathol*. 1999;30:151–157.
18. Stratton JF, Buckley CH, Lowe D, et al. Comparison of prophylactic oophorectomy specimens from carriers and non carriers of a BRCA1 or BRCA2 gene mutation. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(7):626–628.
19. Barakat RR, Federici MG, Saigo PE, et al. Absence of premalignant histologic, molecular, or cell biologic alterations in prophylactic oophorectomy specimen from BRCA1 heterozygotes. *Cancer*. 2000;89:383–390.
20. Heller DS, Hameed M, Baergen R. Lack of proliferative activity of surface epithelial inclusion cysts of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*. 2003;13:303–307.
21. Plaxe S, Deligdisch L, Dottino P, et al. Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1990;38:367–372.
22. Nieto JJ, Crow J, Sundaresan M, et al. Ovarian epithelial dysplasia in relation to ovulation induction and nulliparity. *Gynecol Oncol*. 2001;82:344–349.
23. Brewer MA, Ranger-Moore J, Baruche A, et al. Exploratory study of ovarian intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):299–305.
24. Tok EC, Ertug D, Tataroglu C, et al. Clinicopathologic study of the putative precursor lesions of epithelial ovarian cancer in low-risk women. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16:501–506.
25. Zheng J, Wan M, Zweig S, et al. Histologically low grade malignant tumors adjacent to high grade ovarian carcinomas contain molecular characteristics of high grade carcinomas. *Cancer Res*. 1993;53:4138–4142.
26. Mittal KR, Jacquotte AZ, Cooper JL, et al. Contralateral ovary in unilateral ovarian carcinoma: a search for preneoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol*. 1993;12:59–63.
27. Tressera F, Grases PJ, Labastida R, et al. Histological features of the contralateral ovary in patients with unilateral ovarian cancer: a case control study. *Gynecol Oncol*. 1998;71:437–441.
28. Deligdisch L, Gil J. Characterization of ovarian dysplasia by interactive morphometry. *Cancer*. 1989;63:748–755.
29. Deligdisch L, Miranda C, Barba J, et al. Ovarian dysplasia: nuclear texture analysis. *Cancer*. 1993;72:3253–3257.
30. Deligdisch L, Gil J, Kerner H, et al. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. Cytogenetic and morphometric correlations. *Cancer*. 1999;86(8):1544–1550.
31. Medeiros F, Muto MG, Lee Y, et al. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(2):230–236.
32. Callahan MJ, Crum CP, Medeiros F, et al. Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *J Clin Oncol*. 2007;25(25):3985–3990.
33. Leunen K, Legius E, Moerman P, et al. Prophylactic salpingo-oophorectomy in 51 women with familial breast-ovarian cancer: importance of fallopian tube dysplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16:183–188.
34. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP. Dysplastic changes in prophylactically removed fallopian tubes of women predisposed to ovarian cancer. *J Pathol*. 2001;195:451–456.
35. Crum CP, Drapkin R, Kindelberger D, et al. Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clin Med Res*. 2007;5(1):35–44.

### **Article 3 :**

**Chene G**, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Dauplat MM, Mishellany F, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly JL, Dechelotte P, Dauplat J. Ovarian epithelial dysplasia after ovulation induction : Time and dose effects. **Human Reprod**, 2009 ; 24 (1) : 132-8. IF= 3.7

Cet article décrit la dysplasie en relation avec la stimulation de l'ovulation



# Ovarian epithelial dysplasia after ovulation induction: time and dose effects

G. Chene<sup>1,6</sup>, F. Penault-Llorca<sup>2</sup>, G. Le Bouëdec<sup>1</sup>, F. Mishellany<sup>2</sup>,  
M.M. Dauplat<sup>3</sup>, P. Jaffeux<sup>4</sup>, B. Aublet-Cuvelier<sup>4</sup>, J.L. Pouly<sup>5</sup>,  
P. Dechelotte<sup>3</sup>, and J. Dauplat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology and Surgery, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France <sup>2</sup>Department of Histopathology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France <sup>3</sup>Department of Histopathology, CHU of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France <sup>4</sup>Department of Medical Information, CHU of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France <sup>5</sup>Department of Obstetric, Gynecology and Reproductive Medicine, CHU of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

<sup>6</sup>Correspondence address. Tel: +33-6-07-08-17-86; E-mail: chenegaution@yahoo.fr

## TABLE OF CONTENTS

- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusion
- References

**BACKGROUND:** Ovarian epithelial dysplasia was first described after prophylactic oophorectomies for genetic risk. Ovarian stimulation has been considered as a risk factor of ovarian cancer by Fathalla's incessant ovulation theory. In this study, we have investigated the risk of ovarian dysplasia after ovulation induction.

**METHODS:** We reviewed 99 oophorectomies or cystectomies between 1990 and 2005 divided them into two groups: previous *in vitro* fertilization ( $n = 37$ ) and a panel of fertile controls ( $n = 62$ ). Eleven epithelial cytological and architectural features were defined and an ovarian epithelial dysplasia score was calculated to quantify the degree of ovarian epithelial abnormalities.

**RESULTS:** All the ovaries were macroscopically non-cancerous except in two patients (one endometrioid cancer and one borderline tumour). The mean ovarian dysplasia score was significantly higher in the ovulation induction group than in the control group (7.64 versus 3.62,  $P = 0.0002$ ). We also found a relationship between the number of ovulation-induced cycles and the severity of ovarian dysplasia ('dose-effect') and a relationship between time after the end of ovulation induction (over 7 years) and the severity of ovarian dysplasia ('time-effect').

**CONCLUSIONS:** There is probably a relationship between ovarian epithelial dysplasia and either ovulation inducing drugs or infertility. By Fathalla's incessant ovulation theory, 'the dose effect and the time effect' of ovarian stimulation may explain ovarian dysplasia formation.

**Key words:** female infertility / assisted reproduction / ovarian dysplasia / ovarian stimulation

## Introduction

Epithelial ovarian cancer is the most life-threatening gynaecological cancer, with a low 5 year survival rate estimated at 30–35% when all stages are taken together (Ahmed *et al.*, 1996). Its severity is due essentially to late diagnosis at an advanced stage (peritoneal

carcinomatosis) in two-thirds of cases, which implies a poor prognosis with a survival rate lower than 20%.

On the other hand, the probability of remission is ~90%, if the cancer is diagnosed at an early stage (Stage IA) and 70% if diagnosed at Stage II (Brewer *et al.*, 2003). However, the low specificity and low positive predictive value of the usual screening tests (ultrasonography

and CA 125 antigen assay) (Sassone *et al.*, 1991; Grove *et al.*, 1992) combined with poor knowledge of ovarian carcinogenesis have made it impossible to identify a prediagnostic latency phase amenable to preventive surgery and to mass screening.

The most often cited risk factors for ovarian neoplasia are hereditary predisposition (5–10%) (Ford *et al.*, 1994) and incessant ovulation (Fathalla, 1971) with for this second factor, a hypothetical implication for ovarian stimulation; the role of ovarian stimulation has been suggested (Harris *et al.*, 1992; Whittemore *et al.*, 1992), but is still controversial.

As the histological study of excised material from prophylactic oophorectomies indicated by genetic predisposition has shown frequent abnormalities interpreted as pre-cancerous 'ovarian dysplasia' lesions (Deligdisch *et al.*, 1999), we sought similar lesions in material from oophorectomies carried out after ovarian stimulation during infertility treatment. This may determine the role of ovulation induction as a risk factor of ovarian carcinogenesis and thereby possibly define another group of women at risk.

## Materials and Methods

### Population

Out of a total of 5500 adnexectomies and/or ovarian cystectomies performed between January 1990 and December 2005, we selected 97 patients, who were divided into two groups.

- (i) Exposed group: 35 patients who had previously undergone *in vitro* fertilization (IVF) using ovulation induction, and in whom 37 ovarian adnexectomies and (or) cystectomies had been performed several years later for the indications given in Table II. Two patients underwent surgery twice. None of the patients in this group had presented an ovarian cyst in the ultrasonographic exploration carried out at the initial infertility consultations. This group of patients was obtained by crossing assisted reproduction treatment (ART) records (4500 patients) with surgical adnexectomy records [5500 adnexectomies and (or) ovarian cystectomies] over the period extending from January 1990 to December 2005. The 37 cases comprised 27 adnexectomies (12 unilateral and 15 bilateral) and 10 cystectomies.
- (ii) Control group: 62 fertile patients with no personal or family history of gynaecological neoplasia (breast, ovary or endometrium), who had undergone an adnexectomy and (or) a cystectomy for a benign disorder, and for whom a final histopathological examination showed their ovaries to be non-cancerous. We age-matched this group to the exposed group. To reduce the confounding and protective effect of oral contraceptive use, we selected patients for whom the duration of oral contraceptive use was short. Finally, to obtain a better statistical power, we took two randomly selected controls for one at-risk patient.

### Data collection

The following information was collected along with medical records: general characteristics and habits, gynaecological and obstetric data, and infertility-related variables, i.e. parity, use and duration of contraceptive methods, and use of fertility drugs (Table II). The information obtained was checked by telephone contact, if necessary.

### Histopathological criteria

There is no consensual dysplasia scoring scheme, as the histopathological modifications characteristic of dysplasia are difficult to determine. The definition of dysplasia is thus based on cytological and architectural criteria, and several histopathological scoring scales have been designed based for ovarian dysplasia found in prophylactic oophorectomies for BRCA mutations (Salazar *et al.*, 1996; Stratton *et al.*, 1999; Barakat *et al.*, 2000), in areas adjacent to Stage I ovarian carcinoma (Plaxe *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1993), in the contralateral ovary of women with Stage I ovarian carcinoma (Mittal *et al.*, 1993; Tressera *et al.*, 1998), and in relation to ovulation induction (Nieto *et al.*, 2001). We incorporated all these abnormalities (11 histopathological criteria) to obtain a complete, exhaustive dysplasia scoring system (Table I):

- (i) epithelial multilayering;
- (ii) tufting;
- (iii) surface papillomatosis;
- (iv) nuclear chromatin irregularity;
- (v) nuclear contour irregularity;
- (vi) cellular pleomorphism;
- (vii) nuclear size enlargement;
- (viii) epithelial inclusion cysts;
- (ix) cortical invagination;
- (x) psammoma;
- (xi) stromal hyperplasia: we used the semi-quantitative scale described by Boss *et al.* (1965), to score stromal hyperplasia, i.e. ovarian cortex wider than 1 mm with apparent cellular cortical stroma present in the medulla.

In each case, the abnormal areas were scored from 0 to 2 (0, normal; 1, moderately abnormal; and 2, severely abnormal). A dysplasia score for each patient was obtained simply by summing the scores of the 11 items (total range: 0–22).

All specimens were embedded in paraffin, sectioned at a thickness of 4–5 µm and stained with haematoxylin and eosin. The histopathology slides from the 37 exposed and 62 control patients were all read blindly by four pathologists who were specialists in oncogynaecology pathology in order to obtain an average score. For the cystectomies, the slides

**Table I** Distribution of histopathological abnormalities in material from the exposed group and the control group

	Exposed group (n = 37)	Control group (n = 62)
Epithelial multilayering	25 (67.5%)	17 (27.5%)
Tufting	24 (65%)	23 (37%)
Surface papillomatosis	17 (46%)	15 (24%)
Nuclear chromatin irregularity	18 (48.6%)	18 (29%)
Nuclear contour irregularity	21 (56.8%)	12 (19.4%)
Cellular pleomorphism	23 (62%)	21 (34%)
Nuclear size increase	22 (59%)	13 (21%)
Epithelial inclusion cysts	24 (65%)	31 (50%)
Psammoma	4 (10.8%)	4 (6.5%)
Cortical invagination	13 (35%)	11 (17.3%)
Stromal hyperplasia	9 (24.5%)	10 (16%)

Occurrence is given in absolute values and in percentages (in parentheses).

**Table II** Characteristics of the population at the time of surgery (exposed and controls)

Variable	Exposed group (n = 35)	Control group (n = 62)
Age	40.6 years (26–53)	42.1 (32–51)
BMI	23.2	22.6
Surgical indication		
Metrorrhagia	9	20
Pelvic pain	18	39
Echographic cyst	33	35
Stable tumour	2	0
Nulliparity	7	0
Parity	1.1 (1–3)	2.7 (1–4)
Use of an oral contraceptive	28 (80%)	55 (89%)
Duration of exposure to the oral contraceptive	42.6 months (4–96)	58.2 months (20–180)
First-degree family history of ovarian cancer	0	0
First-degree family history of breast cancer	3	0
First-degree family history of endometrial cancer	1	0

were read to confirm the histopathological diagnosis and inspect associated ovarian tissue to determine its dysplasia score. The average number of slides available for review from the two groups was 7.6 (5–11).

When several slides were available, the one with the highest dysplasia score was used. When there were major disagreements between pathologists, the slides were read again to reach a consensus.

### Statistical analysis

Our main measure was the dysplasia score, with the hypothesis that the ovaries in the exposed group had a higher dysplasia score than in the control group. Comparison of means for the dysplasia scores of the two groups was carried out using Student's *t*-test. The groups were age-matched.

## Results

The exposed population numbered 35 patients of whom two underwent surgery twice, providing 37 samples of excised material. Epidemiological data (parity, duration of exposure to oral contraceptives, surgical indication and age at the time of adnexectomy) are given in Table II. Histopathological features of excised material from the exposed group were mainly benign cysts (35 cysts detected by ultrasonography), except in two patients (one endometrioid cancer and one borderline tumour) (Table III).

Infertility was female in 60% of cases, with the following distribution: ovarian dysovulation 15%, tubal pathology 45% and endometriosis 40%. The cause of infertility was unknown in 26% of all cases (Table IV).

The average number of stimulation cycles was three, with different protocols. We could not study the potential effects of treatment on the stimulation of ovulation owing to the large number of variables and the small sample size.

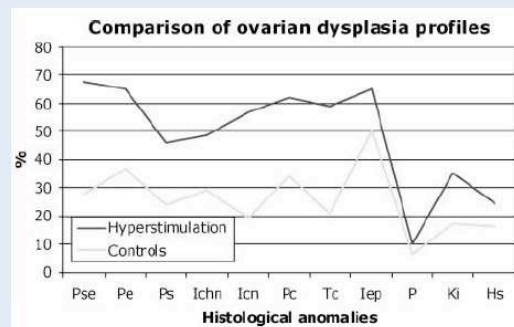
**Table III** Histopathological features of excised material from exposed and control patients

	Exposed (n = 37)	Controls (n = 62)
Pyosalpinx	2	5
Endometrioma	9	12
Serous cystadenoma	6	5
Mucinous cystadenoma	2	6
Ovarian fibroma	0	5
Borderline tumour	1	0
Endometrioid adenocarcinoma	1	0
Follicular cyst	10	9
Haemorrhagic cyst	5	17
Adnexal torsion/ischaemia	1	3

**Table IV** Characteristics of infertility in exposed group (n = 35)

Infertility characteristics	n
Primary infertility	16
Secondary infertility	19
Source of infertility	
Male	6
Female	20
Unknown	9
Ovarian dysovulation	3
Tubal pathology	9
Endometriosis	8
Clomiphene before stimulation for more than 6 months	2
Number of stimulation cycles	3 (1–7)
Treatments	
Clomiphene alone	0
Gonadotrophins alone	3
Clomiphene and gonadotrophins	10
Agonists of GnRH and gonadotrophins	10
Clomiphene, gonadotrophins and agonists of GnRH (in several ART courses)	12
Mean dose and duration of clomiphene	100 mg/day for 5 days
Mean duration of stimulation	11 days (8–15)
Positive outcome of stimulation	
Single pregnancy	17
Multiple pregnancy	2
Negative outcome of stimulation	16
Mean interval between stimulation and adnexectomy/cystectomy	8.6 years (2–19)

The histopathological abnormalities (Table I, Fig. 1) in the exposed group were almost always present and marked, occurring in ~49%, except for psammoma (10%) and stromal hyperplasia (24.5%).



**Figure 1** Comparison of ovarian dysplasia profiles between exposed and controls. Representative numbers are in Table I. Epithelial multilayering, Pse; tufting, Pe; surface papillomatosis, Ps; nuclear chromatin irregularity, Ichn; nuclear contour irregularity, Icn; cellular pleomorphism, Pc; nuclear size, Tc; epithelial inclusion cysts, Iep; psammoma, P; cortical invagination, Ki; stromal hyperplasia, Hs.

The most frequently occurring abnormalities were epithelial multilayering (67.5%), tufting (65%), epithelial inclusion cysts (65%) and cellular pleomorphism (62%). These abnormalities were usually less frequent in the controls, occurring in ~25%, except for the epithelial inclusion cysts, which were found in 50% of cases.

From these findings, a mean dysplasia score was calculated for the exposed group by averaging the scores of all the exposed patients. The average dysplasia score for the exposed patients was 7.64. The mean dysplasia score determined likewise for the controls was 3.62. This difference was highly statistically significant ( $P = 0.0002$ ).

In addition, we found a statistically significant effect for the time interval between IVF and the adnexectomy or cystectomy. When this interval was <7 years, the mean dysplasia score was 1.28 compared with 11.52 after 7 years (>7 years) ( $P = 0.0001$ ).

This 'time effect' (Fig. 2) is a new finding not described before: it seems that the dysplasia is installed gradually and becomes significant after a lag time evaluated here at 7 years. Once this time has elapsed, the dysplasia becomes permanent and can even worsen over time (Fig. 2).

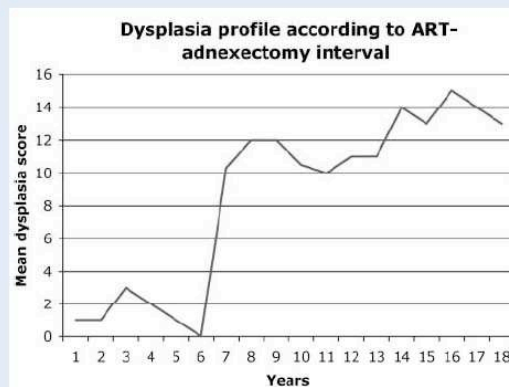
The number of stimulations is also appears to be important: one or two stimulations gave a mean dysplasia score of 3.4, whereas three or more stimulations raised the score to 10.7, with the difference being statistically significant ( $P = 0.0057$ ).

The dysplasia also appeared to be more severe in refractory primary infertility, when stimulation failed, than when stimulations resulted in pregnancy. However, the difference was not statistically significant.

There was no statistical difference in the mean dysplasia score according to whether there was a positive or negative outcome of the ART (7.23 versus 9.42,  $P = 0.34$ ).

## Discussion

The Fathalla hypothesis (Fathalla, 1971) regarded incessant ovulation as a risk factor of epithelial ovarian carcinoma. Each ovulation on



**Figure 2** Dysplasia profile according to ART-adnexectomy interval. When the time interval between the IVF and the adnexectomy or cystectomy was <7 years ( $n = 14$ ), the mean dysplasia score was 1.28 compared with 11.52 ( $P < 0.0001$ ) after 7 years ( $n = 23$ ).

the surface epithelium of the ovary could lead to a scar. During healing the invagination of the surface epithelium (Fig. 3A), cells in the stroma can form inclusion cysts (Fig. 3B) in a micro-environment in which the epithelial cells are subject to paracrine control, to the action of cytokines such as interleukins 1 and 6 and to the influence of growth factors stimulating cell proliferation (Berchuck *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1999; Wong and Auersperg, 2003). This hypothesis is consistent with the results of some experimental works and epidemiological studies (Harris *et al.*, 1992; Whittemore *et al.*, 1992).

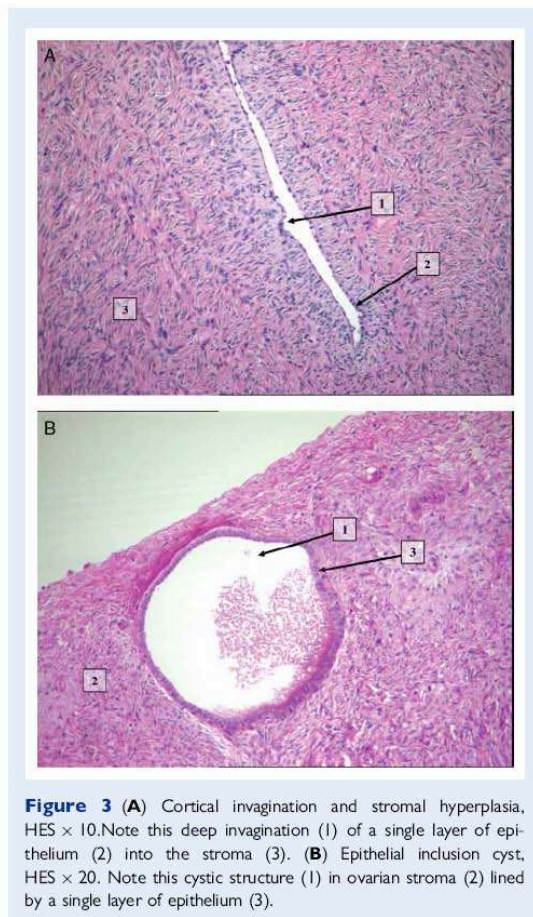
On the other hand, pregnancy, lactation and the oral contraceptive pill have a well-known protective effect due to the absence of ovulation (Wu *et al.*, 1988; Gross and Schlesselman, 1994). Hence ovarian stimulation was suspected to be a risk.

The first histopathological description of ovarian dysplasia was reported in the study of Gusberg and Deligdisch (1984), who examined prophylactic adnexectomy material from three females whose monozygotic twins had invasive cancers of the ovary (one endometrioid adenocarcinoma and two serous papillary adenocarcinomas, one grade II and the other grade III). In all three cases, the ovaries were macroscopically normal. However, microscopic inspection revealed various cytological and architectural anomalies: surface papillomatosis, epithelial inclusion cysts, nuclear pleomorphism, epithelial multilayering and cortical invaginations. By analogy with the other precancerous lesions of the genital tract, the association of these different abnormalities was termed ovarian dysplasia, or ovarian precancerous lesions (Resta *et al.*, 1993).

Ovarian dysplasia is not a subjective impression related to the individual experience of the pathologist: it differs from normal ovarian tissue and from cancerous tissue, as was recently confirmed by Deligdisch in the work on morphometry and nuclear texture analysis (Deligdisch and Gil, 1989; Deligdisch *et al.*, 1993, 1995).

Nieto *et al.* (2001) was the first to describe similar lesions after induced ovulation. We set out to confirm these abnormalities and adapted his score (designed for stimulated ovaries), adding further cytological criteria (epithelial inclusion cysts, cortical invaginations,





**Figure 3** (A) Cortical invagination and stromal hyperplasia, HES  $\times 10$ . Note this deep invagination (1) of a single layer of epithelium (2) into the stroma (3). (B) Epithelial inclusion cyst, HES  $\times 20$ . Note this cystic structure (1) in ovarian stroma (2) lined by a single layer of epithelium (3).

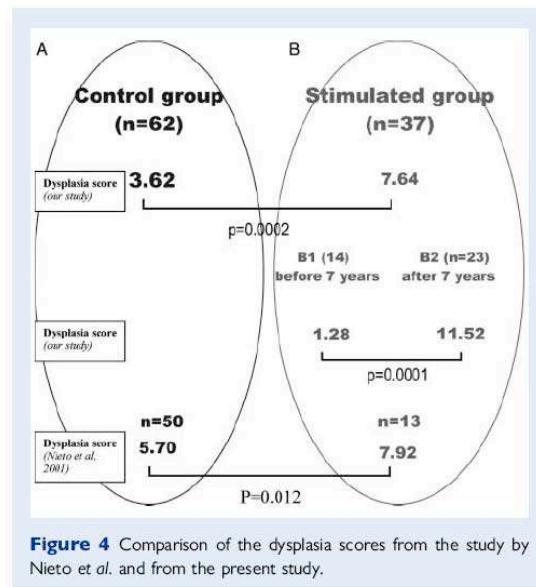
psammomas and stromal hyperplasia) described in dysplastic lesions adjoining ovarian cancers. [Our exhaustive dysplasia score was also recently used on a cohort with ovarian dysplasia found in prophylactic oophorectomy for BRCA mutation (Chene et al., 2008a, b).]

The results of the present were comparable with those of Nieto et al. (2001), namely significant presence of dysplasia in stimulated ovaries (7.90 versus 5.7  $P = 0.012$  in Nieto study, 7.64 versus 3.62  $P < 0.0002$  in ours) (Fig. 4). Our findings thus corroborate those of Nieto, with an appreciable gain in statistical power from three times more patients in the exposed group.

We also found evidence for two new effects.

### The dose effect

The presence of histopathological abnormalities (and severity of dysplasia) seems to be linked to the intensity and number of hyperstimulations. The average number of stimulation cycles was three. There were 12 patients who had only one or two stimulations, whereas 23 had three or more; the dysplasia scores were, respectively, 3.4 and 10.7 ( $P = 0.0057$ ).



**Figure 4** Comparison of the dysplasia scores from the study by Nieto et al. and from the present study.

This is consistent with the theory of Fathalla (1971): a cumulated dose at least above a certain threshold (i.e. a high number of induced ovulations) can generate dysplastic lesions, with the intensity of the response in terms of dysplasia being dose-related. Although there was a significant difference here between one or two stimulations and several stimulations, there was only a very weak correlation between dysplasia severity score and frequency of stimulation. The correlation coefficient between these two variables was 0.22475 ( $P = 0.1811$ ) with  $R^2 = 0.0505$ , i.e. only 5.1% of each variable was in correlation.

In contrast, when we took only those variables with a time interval of more than 7 years between the first stimulation and the adnexectomy (see below), the correlation coefficient was 0.6 ( $P = 0.0020$ ) with  $R^2 = 0.3878$ , i.e. nearly 40% correlation. In other words, in this subgroup, a greater the number of stimulations was associated with a worse dysplasia score. Animal experiments have led to the same conclusions. Thus, ovulation in rats has resulted in increased Ki67 expression and dysplastic features in the ovarian epithelial cells (Corakci et al., 2005). Celik et al. (2004) compared the rate of ovarian dysplasia in three groups of rats subjected, respectively, to one, three and six gonadotrophin cycles: there was a trend towards more severe dysplasia as the number of induced ovulation cycles increased.

Given our small sample size, we could not compare the different drug treatments. However, in the IVF group, 63% of the patients were stimulated by clomifene in association with FSH/HMG, which is an infrequent protocol for IVF stimulation, mainly used at the beginning of the IVF era. Clomifene has been shown to be the most harmful drug (Rossing et al., 1994).

### The time effect

After confirmation of the presence of dysplasia lesions in stimulated ovaries, we observed a 'time effect' not hitherto reported in the

literature, namely the existence of a time interval after ART treatment during which the ovaries are healthy and non-dysplastic and beyond which they appear abnormal and clearly dysplastic.

When the interval between stimulation and adnexectomy was 6 years or less, the dysplasia score was 1.28 compared with 11.52 ( $P < 0.0001$ ) after an interval of 7 or more years: this difference was highly significant. This finding also held for longer times intervals (Fig. 2).

This empirical finding was not expected. At the beginning of the study, by analogy with the dysplasia found in prophylactic ovariectomy material excised for genetic risk, and based on the incessant ovulation hypothesis, we had simply postulated that stimulated ovaries could be the site of dysplastic lesions.

In the course of statistical analysis, we were surprised to find that recently stimulated ovaries were not dysplastic, unlike ovaries that had been first stimulated more than 7 years previously.

This time effect is unlikely to be mere coincidence. We were fortunate to have in our sample, two patients who had been operated on twice. One of these had a cystectomy in 2000, 5 years after stimulation, and then again in 2001, 6 years after stimulation: in both cases, the dysplasia score was nil. The other patient had a cystectomy in 1999, 5 years after stimulation, and then again in 2004, 11 years after stimulation. The first dysplasia score was nil, but the second was 10.

Combining these two effects, the dose effect and the time effect, we propose the following scheme for ovarian dysplasia formation (as distinct from cancer formation). One or two cycles of ovarian stimulation do not seem to induce any changes in epithelial ovarian surface. However, several cycles of ovarian stimulations seem to induce changes in histology of epithelial ovarian surface that remain latent for several years. These changes may be evaluative and lead to irreversible dysplastic lesions after 7 years or more. Evolution of dysplasia is uncertain in stimulated ovaries, although dysplasia in genetic ovaries (BRCA mutation) is a well-known risk factor of ovarian cancer: ART might be responsible for triggering a process of ovarian neoplastic formation, thereby putting these patients at risk.

Evidence of a time interval necessary for the appearance of these cytological and architectural modifications suggests that ovarian stimulation triggers a chain of cellular events culminating in a progressive biological process.

However, these findings must be interpreted with caution. We have no proof that these histopathological abnormalities are an early stage in the irreversible development of a malignancy. Ovarian cancer formation is a complex, stochastic, multifactorial process in which there is not necessarily a transition from a dysplasia to cancer. Our study is purely of observational value. We found that our sample of stimulated ovaries presented dysplastic lesions. We had no data concerning other stimulated patients, and so we do not know the true prevalence of ovarian dysplasia after stimulation. We had no way of knowing whether any of the cases of dysplasia would have subsequently developed into borderline lesions or cancer. In addition, these results do not imply that ovulation-inducing drugs are oncogenic, but the results would be compatible with the genetic theory whereby several mutations can induce both hypofertility and susceptibility to cancer of the ovary (in a similar way to which BRCA 1 and 2 mutations interact).

It should also be noted that we cannot know whether the ovarian epithelial dysplasia is directly associated with ovulation induction or

whether there is a common link underlying infertility and ovarian dysplasia. Indeed, infertility is a well-known confounding effect because it is a risk factor for ovarian cancer, thus a common link underlying infertility itself and dysplasia is possible (Nieto *et al.*, 1999). Another new study is planned to assess the exact responsibility of ovulation inducing drugs and infertility in ovarian dysplasia.

The frequent use of clomifene in these cases must also be taken into account as these drugs appear to increase the risk of borderline ovarian tumours (Parazzini *et al.*, 1998; Sushan *et al.*, 1999; Ness *et al.*, 2002; Mahdavi *et al.*, 2006).

On the other hand, among the 4500 patients undergoing IVF, the incidence of ovarian cysts was low and the ovarian cancer rate (one cancer and one borderline tumour) was low in comparison with the expected incidence and with the fact that five ovarian cancers or borderline tumours were found during the pre-IVF check-up during the same period.

## Conclusion

This study shows that more ovarian histopathological abnormalities are found after stimulation than in a control population, suggesting the responsibility of ovulation induction in the appearance of dysplastic lesions (Chene *et al.*, 2008a, b). Further works are necessary to study the link between infertility and ovarian dysplasia, to improve and validate our dysplasia scoring scheme in ovulation induction groups and to confirm the dose and time effects.

## References

- Ahmed FY, Wiltshaw E, Ahern RP, Nicol B, Shepherd J, Blake P, Fisher C, Gore ME. Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1996;**14**:2968–2975.
- Barakat RR, Federici MG, Saigo PE, Robson ME, Offit K, Boyd J. Absence of premalignant histologic, molecular, or cell biologic alterations in prophylactic oophorectomy specimen from BRCA1 heterozygotes. *Cancer* 2000;**89**:383–390.
- Berchuck A, Kohler MF, Boente MP, Rodriguez GC, Whitaker RS, Bast RC. Growth regulation and transformation of ovarian epithelium. *Cancer* 1993;**71**(Suppl 2):545–551.
- Boss JH, Scully RE, Wegner KH, Cohen RB. Structural variations in the adult ovary. Clinical significance. *Obstet Gynecol* 1965;**25**:747–764.
- Brewer MA, Johnson K, Follen M, Gershenson D, Bast RJ. Prevention of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 2003;**9**:20–30.
- Celik C, Gerginc K, Aktan M, Acar A, Yaman ST, Gungor S, Akyurek C. Effects of ovulation induction on ovarian morphology: an animal study. *Int J Gynecol Cancer* 2004;**14**:600–606.
- Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouëdec G, Mishellany F, Dauplat MM, Jaffaux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly JL, Déchelotte P, Dauplat J. Ovarian epithelial dysplasia and prophylactic oophorectomy for genetic risk. *Int J Gynecol Cancer* 2008a, in press.
- Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouëdec G, Mishellany F, Dauplat MM, Tardieu AS, Pomel C, Jaffaux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly JL *et al.* Ovarian epithelial dysplasia: Myth or reality. Review. *Gynecol Obstet Fertil* 2008b;**36**:800–807.
- Corakci A, Filiz S, Caliskan E, Dalcik C, Ozeren S, Dalcik H. The effects of ovulation induction on ovarian epithelium dysplasia scores and Ki67 expression: an experimental study on rats. *Int J Gynecol Cancer* 2005;**15**:866–871.

- Deligdisch L, Gil J. Characterization of ovarian dysplasia by interactive morphometry. *Cancer* 1989;**63**:748–755.
- Deligdisch L, Miranda C, Barba J, Gil J. Ovarian dysplasia: nuclear texture analysis. *Cancer* 1993;**72**:3253–3257.
- Deligdisch L, Einstein AJ, Guera D, Gil J. Ovarian dysplasia in epithelial inclusion cysts. *Cancer* 1995;**76**:1027–1034.
- Deligdisch L, Gil J, Kerner H, Wu HS, Beck D, Gershoni-Baruch R. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. *Cancer* 1999;**86**:1544–1550.
- Fathalla M. Incessant ovulation: a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;**2**:163.
- Ford D, Easton DF, Bishop T, Narod SA, Goldgar DE. Risk of cancer in BRCA1 mutation carriers. *Lancet* 1994;**343**:692–695.
- Gross TP, Schlesselman JJ. The estimated effect of oral contraceptive use on the cumulative risk of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1994;**83**:419–424.
- Grove S, Quinn MA, Weidman P, Hoon Koh. Factors influencing serum CA125 levels in normal women. *Obstet Gynecol* 1992;**79**:511–514.
- Gusberg SB, Deligdisch L. Ovarian dysplasia, a study of identical twins. *Cancer* 1984;**54**:1–4.
- Harris R, Whittemore AS, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. *Am J Epidemiol* 1992;**136**:1204–1211.
- Mahdavi A, Pejovic T, Nezhat F. Induction of ovulation and ovarian cancer: a critical review of the literature. *Fertil Steril* 2006;**85**:819–826.
- Mittal KR, Jacquotte AZ, Cooper JL, Demopoulos R. Contralateral ovary in unilateral ovarian carcinoma: a search for preneoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol* 1993;**12**:59–63.
- Ness RB, Cramer DW, Goodman MT. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* 2002;**155**:217–224.
- Nieto JJ, Rolfe KJ, McLean AB, Hardiman P. Ovarian cancer and infertility: a genetic link. *Lancet* 1999;**354**:649.
- Nieto JJ, Crow J, Sundaresan M, Constantinovici N, Perret CW, McLean AN, Hardiman PJ. Ovarian epithelial dysplasia in relation to ovulation induction and nulliparity. *Gynecol Oncol* 2001;**82**:344–349.
- Parazzini F, Negri E, La Vecchia C, Moroni S, Polatti A, Chiaffarino F. Treatment for infertility and risk of ovarian tumors of borderline malignancy. *Gynecol Oncol* 1998;**68**:226–228.
- Plaxe S, Deligdisch L, Dottino P, Cohen C. Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1990;**38**:367–372.
- Resta L, Russo S, Colucci GA, Prat J. Morphologic precursors of ovarian epithelial tumors. *Obstet Gynecol* 1993;**82**:181–186.
- Rosling MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE, Self SG. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med* 1994;**331**:771–776.
- Salazar H, Godwin AK, Daly MB, Laub PB, Hogan M, Rosenblum N, Boente MP, Lynch HT, Hamilton TC. Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies. *J Natl Cancer Inst* 1996;**88**:1810–1820.
- Sassone AM, Timor-Tritsch IE, Artner A, Westhoff C, Warren WB. Transvaginal sonographic characterization of ovarian disease: evaluation of a new scoring system to predict ovarian malignancy. *Obstet Gynecol* 1991;**78**:70–73.
- Stratton JF, Buckey CH, Lowe D, Ponder BAJ. Comparison of prophylactic oophorectomy specimens from carriers and noncarriers of a BRCA1 or BRCA2 gene mutation. *J Natl Cancer Inst* 1999;**91**:626–628.
- Sushan A, Paltiel O, Schencker JG. Induction of ovulation and borderline ovarian cancer—the hormonal connection? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;**85**:1–4.
- Tressera F, Grases PJ, Labastida R, Ubieda A. Histological features of the contralateral ovary in patients with unilateral ovarian cancer: a case control study. *Gynecol Oncol* 1998;**71**:437–441.
- Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. *Am J Epidemiol* 1992;**136**:1184–1203.
- Wong AST, Auersperg N. Ovarian surface epithelium: family history and early events in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;**70**:1–8.
- Wong AST, Maines-Bandiera SL, Rosen B, Wheelock MJ, Johnson KR, Leung PC, Roskelley CD, Auersperg N. Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. *Int J Cancer* 1999;**81**:180–188.
- Wu ML, Whittemore AS, Paffenbarger RS, Sarles DL, Kampert JB, Grosser S, Jung DL, Ballon S, Hendrickson M, Mohle Boetani J. Personal and environmental characteristics related to epithelial ovarian cancer. Reproductive and menstrual events and oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* 1988;**128**:1216–1227.
- Zheng J, Wan M, Zweig S, Veliescu M, Yu MC, Dubeau L. Histologically benign or low grade malignant tumors adjacent to high grade ovarian carcinomas contain molecular characteristics of high grade carcinomas. *Cancer Res* 1993;**53**:4138–4142.

Submitted on February 14, 2008; resubmitted on September 1, 2008; accepted on September 10, 2008

#### **Article 4 :**

Dauplat J, **Chene G**, Le Bouedec G, Dauplat MM, Mishellany F, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly JL, Dechelotte P, Penault-Llorca F. Comparison of dysplasia profiles in stimulated ovaries and in those with a genetic risk for ovarian cancer. **Eur J Cancer. 2009; 45 (17); 2977-83 IF= 4.5**

Cet article compare les profils de dysplasie génétique et en relation avec la stimulation de l'ovulation.



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.ejconline.com](http://www.ejconline.com)

## Comparison of dysplasia profiles in stimulated ovaries and in those with a genetic risk for ovarian cancer

J. Dauplat<sup>a</sup>, G. Chene<sup>a,b,\*</sup>, C. Pomel<sup>a</sup>, M.M. Dauplat<sup>c,d</sup>, G. Le Bouëdec<sup>a</sup>, F. Mishellany<sup>c</sup>, N. Lagarde<sup>c</sup>, Y.J. Bignon<sup>e</sup>, P. Jaffeux<sup>f</sup>, B. Aublet-Cuvelier<sup>f</sup>, P. Dechelotte<sup>d</sup>, J.L. Pouly<sup>g</sup>, F. Penault-Llorca<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Surgery, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup>Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine, CHU St. Etienne, France

<sup>c</sup>Department of Histopathology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France

<sup>d</sup>Department of Histopathology, CHU Clermont-Ferrand, France

<sup>e</sup>Department of Molecular Oncology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France

<sup>f</sup>Department of Medical Information, CHU Clermont-Ferrand, France

<sup>g</sup>Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine, CHU Clermont-Ferrand, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 April 2009

Received in revised form 9 June 2009

Accepted 12 June 2009

Available online 12 October 2009

#### Keywords:

Ovarian dysplasia

Ovarian cancer

BRCA mutation

Ovulation induction

### ABSTRACT

**Aim:** Ovarian epithelial dysplasia (OED) was first described after prophylactic oophorectomy for genetic risk of ovarian cancer. In light of Fathalla's incessant ovulation theory, this study was set up to describe the presence of ovarian abnormalities (dysplasia) after ovulation induction and to compare dysplasia profiles in stimulated and genetic risk ovaries.

**Methods:** One-hundred and twenty-four patients who had undergone salpingo-oophorectomies or ovarian cystectomies between 1990 and 2005 were reviewed. They were divided into three groups: (1) previous in vitro fertilisation ( $n = 35$ ); (2) prophylactic oophorectomies for genetic risk ( $n = 27$ ) and (3) fertile non-cancerous controls ( $n = 62$ ). Eleven cytological and architectural epithelial features were defined and a dysplasia score was calculated to quantify ovarian epithelial abnormalities.

**Results:** Mean dysplasia score was significantly higher in the genetic risk and stimulated ovary groups than in controls (9.55 versus 3.62,  $p < 0.0001$ ; 7.51 versus 3.62,  $p < 0.0002$ , respectively). Cytological and architectural abnormalities were more frequent in the genetic risk group, while the profile of abnormalities was different in the genetic risk and stimulated groups.

**Conclusions:** These findings support a possible relationship between OED and the use of ovulation-stimulating drugs. The increased dysplasia score in stimulated and genetic risk ovaries might be consistent with progression towards neoplastic transformation, and may justify the use of the term dysplasia or intraepithelial ovarian neoplasia. The observation of dysplasia in the stimulated group may differentiate women at risk. Conversely, the fact that the dysplasia profile after stimulation differs from that in genetic risk ovaries suggests that ovarian stimulation may predispose to a different evolution.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Address: Department of Surgery, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France. Tel.: +33 6 07 08 17 86; fax: +33 4 77 82 89 56.

E-mail address: [chenegautier@yahoo.fr](mailto:chenegautier@yahoo.fr) (G. Chene).

0959-8049/\$ - see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ejca.2009.06.012

## 1. Introduction

Ovarian serous carcinoma is the most threatening type of gynaecological cancer: 70% of patients die from the disease within 5 years, essentially because of late diagnosis at the advanced peritoneal carcinomatosis stage (stages III and IV).<sup>1</sup> The prognosis is excellent in the early stages of the disease, but the lack of a specific pattern of symptoms, poor anatomical accessibility of the ovaries and incomplete knowledge of the growth kinetics of this type of tumour and of a possible clinical latency phase impede efficient screening, which is currently not advocated.<sup>2</sup>

The identification of precancerous lesions of the ovary would be an important advance in our understanding of ovarian cancer formation and, as for other gynaecological cancers, might allow the development of effective screening and prevention programmes.<sup>3</sup>

In addition to genetic predisposition (BRCA mutations) or family history of ovarian neoplasia, epidemiological studies show that long periods of ovulation and uninterrupted ovulation are risk factors for ovarian cancer.<sup>4,5</sup> These findings led Fathalla<sup>6</sup> to advance the incessant ovulation hypothesis whereby repair of the ovulation scar at the surface of the epithelium could trigger carcinogenesis. Following on from this hypothesis, the possible role of ovarian hyperstimulation has also been addressed, but remains controversial.

Histopathological examination of material from prophylactic salpingo-oophorectomies performed in patients at genetic risk has revealed frequent abnormalities often interpreted as possible pre-cancerous 'ovarian dysplasia' lesions.<sup>7</sup> We sought to identify similar lesions in excised material from salpingo-oophorectomies performed for benign disease after ovarian hyperstimulation as part of sterility treatment, and to compare them with the dysplastic lesions found in ovaries at genetic risk.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

One-hundred and twenty-four patients were selected out of a total of 5500 patients who had undergone adnexectomies (salpingo-oophorectomies) and/or ovarian cystectomies between January 1990 and December 2005. These patients were divided into three groups: (1) Group A or control group: 62 patients who underwent adnexectomy. Patients who had no personal family history of gynaecological neoplasia (breast, ovary or endometrium), who had undergone an adnexectomy and/or cystectomy for a benign disorder and whose final histopathological report showed non-cancerous ovaries were selected first. This cohort was then age-matched to Group B (see below). To reduce the confounding and protective effect of oral contraceptives, patients who had opted for an intrauterine contraceptive device were selected. Finally, to obtain better statistical power, two randomly selected controls were chosen for each at-risk patient. (2) Group B: 33 patients, including two who underwent surgery twice, providing 35 samples of excised material. Patients in this group underwent an adnexectomy and/or ovarian cystectomy and had previously undergone ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilisation. None

of the patients in this group had an ovarian cyst identified by echography during the initial sterility examination. A few years after hyperstimulation these patients underwent an adnexectomy and/or ovarian cystectomy. This group of patients was obtained by crossing the MAP records (4500 patients) with the surgical records for adnexectomies (5500 adnexectomies and/or ovarian cystectomies) from January 1990 to December 2005. Group B consisted of two subpopulations defined according to the time interval between stimulation and cystectomy/ovariectomy: Group B1 (*n* = 14) with a time gap <7 years, and Group B2 (*n* = 21) with a time gap >7 years. (3) Group C: patients who had undergone bilateral prophylactic salpingo-oophorectomies for confirmed genetic predisposition (BRCA 1 or 2 gene mutation) or had a strong family history of gynaecological cancer (breast and/or ovarian), with no further pregnancy desired and aged > 35 years. Twenty-seven patients were identified who had undergone a prophylactic adnexectomy after detection of the BRCA 1 (12 patients) or BRCA 2 (two patients) gene mutation, or because of a notable family history of ovarian and/or breast neoplasia (13 patients). Group C therefore consisted of two subpopulations: Group C1: patients (*n* = 13) with no BRCA mutation, and Group C2: patients (*n* = 14) with a confirmed gene mutation.

### 2.2. Histopathological criteria

Our definition of ovarian atypia was based on previous studies of ovarian dysplasia, in particular those described by Nieto and colleagues,<sup>8</sup> to which we added four further criteria. In order for the method to be reproducible, 11 histopathological criteria were selected: epithelial multilayering, tufting, surface papillomatosis, nuclear chromatin irregularity, nuclear contour irregularity, cellular pleomorphism, nuclear size (increased or not), epithelial inclusion cysts, deep epithelial cortical invaginations, psammoma and stromal hyperplasia.

In each case the abnormal areas were scored from 0 to 2 (0 = normal, 1 = moderately abnormal, 2 = severely abnormal), whether they were located at the surface or located in an inclusion cyst. A dysplasia score for each patient was obtained by adding the scores for the 11 items (total score range, 0–22).

The histopathological slides of the 35 stimulated ovaries, 27 at-risk ovaries and 62 controls were all read blindly by four pathologists who were experts in onco-gynaecology. The average number of sections available per patient from the three groups was seven (range, 5–11) and the slide with the highest dysplasia score for each patient was retained. When there were major disagreements between pathologists, the slides were read again to reach a consensus.

### 2.3. Statistical analysis

The main measurement was the dysplasia score, with the working hypothesis that Group C ovaries (those at genetic risk) would have a higher dysplasia score than control ovaries.

A comparison of the mean dysplasia scores for the three groups was carried out using Student's *t*-test. All groups were age-matched.

### 3. Results

#### 3.1. Epidemiological data

The epidemiological data for the patients (parity, duration of exposure to oral contraceptives, surgical indication and age at oophorectomy) are given in Table 1.

In Group B, the females were infertile in 61% of cases (ovarian dysovulation 15%, tubal pathology 45% and endometriosis 40%) and the male partners in 18%. The cause of infertility was unknown in 21% of cases.

The average number of stimulation cycles was three, with different protocols used. The potential impact of the various drugs could not be studied because treatments were often combined and the numbers were low.

All patients in Group C, by definition, presented with a family history of cancer; 82% had a family history of breast cancer at an early age (mean, 44 years). Personal and family history prompted screening for BRCA 1 or 2 mutations, which were found in 53.5% of cases.

#### 3.2. Cytological and architectural abnormalities

Cytological and architectural abnormalities of the ovarian epithelium were rare in controls (Group A), frequent in the stimulated ovaries group (Group B) and even more frequent in the genetic risk group (Group C).

From these data, a mean dysplasia score was calculated for each group. The mean dysplasia scores of Groups A, B and C were 3.62, 7.51 and 9.55, respectively.

There was a statistically significant difference between dysplasia scores for Group B and controls (7.51 versus 3.62,  $p < 0.0002$ ), and between Group C and controls (9.55 versus 3.62,  $p < 0.0001$ ), but not between Group B and Group C ( $p = 0.1$ ).

Abnormalities were more marked in women with proven BRCA mutations (Group C2: dysplasia score = 11.14) than in women with only a family history of ovarian or breast cancer (Group C1, dysplasia score = 8.1), although this difference was not statistically significant.

Finally, a time-effect was noted in stimulated women: abnormalities were rare within 7 years of stimulation (Group B1, dysplasia score = 1.28), but appeared more frequently after this time period (Group B2, dysplasia score = 11.66); this difference was statistically significant ( $p < 0.0001$ ).

These results are summarised in Table 2, which shows that the number of abnormalities seems to increase with the level of risk.

#### 3.3. Histopathological characteristics of excised material

The histopathological features of the excised tissue from Group A were always benign (Table 3). Likewise, the histopathological features of excised material from Group B were always benign cysts (33 cysts detected by ultrasonography) (Table 3).

Histopathological abnormalities were most often absent in the control group (Group A), except for inclusion cysts which were present in approximately 50% (Table 2). Inclusion cysts were often observed in the stimulated ovaries (Group B) and prophylactic ovariectomies (Group C) groups (Table 2).

The abnormalities most often found in Group B included: epithelial multilayering (66%), tufting (66%), inclusion cysts (63%) and cellular pleomorphism (60%). The rarest patterns were psammoma (8.5%) and stromal hyperplasia (20%).

Finally, in Group C, the most representative histopathological abnormalities were: inclusion cysts (92.5%), tufting (85%), stromal hyperplasia (74%) and epithelial multilayering (67%). According to these differences, a 'profile of dysplasia' can be drawn for each group (Table 2 and Fig. 1).

### 4. Discussion

The first histopathological observation of ovarian dysplasia was reported by Gusberg and Deligdisch in 1984.<sup>9</sup> These authors examined excised material from prophylactic adnexectomies carried out on three women whose monozygotic twins had invasive cancer of the ovary. In all three cases, the ovaries were macroscopically normal. However, microscopic analysis revealed various cytological and architectural anomalies such as surface papillomatosis, inclusion cysts, nuclear pleomorphism, epithelial multilayering and epithelial invaginations. By analogy with other precancerous lesions of the genital tract, the association of these various abnormalities was designated ovarian dysplasia or ovarian precancerous lesions.

Ovarian dysplasia is thus defined by the presence of cytological and architectural changes which are potentially precancerous: multilayering, tufting, papillomatosis, nuclear chromatin irregularity, cellular pleomorphism, nuclear size and loss of polarity. Inclusion cysts, deep epithelial cortical invaginations, psammoma bodies and stromal hyperplasia are histological changes that are often associated with dysplasia and are possibly seen in a 'preneoplastic phenotype'.<sup>9,10</sup> Several histopathological scores have been devised based on abnormalities found in areas adjacent to stage 1

**Table 1 – Demographic characteristics of the study population at the time of surgery.**

Variable	Control Group A (n = 62)	Stimulated Group B (n = 35)	Genetic risk Group C (n = 27)
Age (years) (range)	42.1 (32–51)	40.7 (26–53)	46.3 (37–62)
Body mass index	22.6	23.4	23.5
Nulliparity	0	7	0
Parity	2.7 (1–4)	1.1 (1–3)	1.9 (1–4)
Use of oral contraception	55 (89%)	28 (80%)	13 (46.5%)
Duration of exposure to oral contraception (months) (range)	58.2 (20–180)	41.2 (4–96)	86.7 (0–240)



**Table 2 – Comparison of ovarian dysplasia profiles in the three groups.**

	Control Group A (n = 62)	Stimulated Group B (n = 35)	Genetic risk Group C (n = 27)	P*
Epithelial multilayering	27.5	66	67	0.9902
Tufting	37	66	85	0.0657
Surface papillomatosis	24	43	41	0.9051
Nuclear chromatin irregularity	29	46	52	0.7584
Nuclear contour irregularity	19.5	57	63	0.6987
Cellular pleomorphism	34	60	48	0.3582
Increased nuclear size	21	60	11	<0.0001
Epithelial inclusion cysts	50	63	92.5	0.0077
Psmammoma	6.5	8.5	44	0.008
Cortical invagination	17.5	31.5	48	0.2854
Stromal hyperplasia	16	20	74	<0.0001

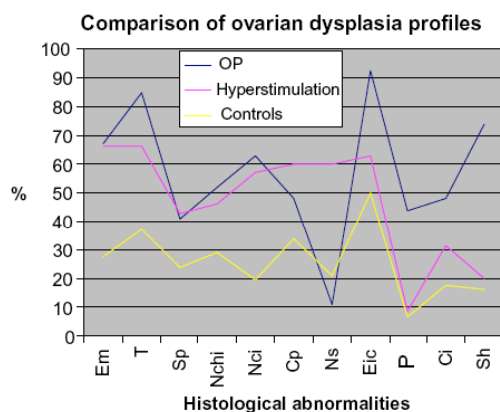
All results shown are percentages.

\* P: prophylactic oophorectomy versus stimulated group.

**Table 3 – Histopathological features of excised material.**

	Group A (n = 62)	Group B (n = 35)	Group C (n = 27)
Pyosalpinx	5	2	0
Endometrioma	12	9	1
Serous cystadenoma	5	6	4
Mucinous cystadenoma	6	2	3
Ovarian fibroma	5	0	1
Follicular cyst	9	10	6
Haemorrhagic cyst	17	5	2
Torsion/ischaemia of adnexum	3	1	0
Normal ovaries	0	0	10

ovarian carcinoma,<sup>11,12</sup> in the contralateral ovary of women with stage 1 ovarian carcinoma<sup>13,14</sup> and in prophylactic oophorectomies for BRCA mutations.<sup>10,15–19</sup>



**Fig. 1 – Comparison of ovarian dysplasia profiles. Legend:** Em, Epithelial multilayering; T, Tufting; Sp, Surface papillomatosis; Nchi, Nuclear chromatin irregularity; Nci, Nuclear contour irregularity; Cp, Cellular pleomorphism; Ns, Nuclear size (increased or not); Eic, Epithelial inclusion cysts; P, Psmammoma; Ci, Cortical invaginations; Sh, Stromal hyperplasia.

Further evidence for ovarian dysplasia being distinct from cancerous and normal ovarian epithelium was provided by morphometry and nuclear texture analysis.<sup>20,21</sup>

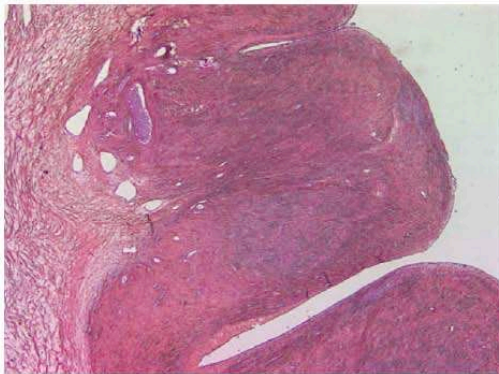
In 1971, Fathalla<sup>6</sup> suggested from the higher frequency of ovarian cancer in nulliparous women that ovulation might be implicated in malignant modification of the ovarian epithelium. Every ovulation breaches the epithelial surface. During healing of the invaginations of the surface epithelium (Photos 1 and 2), cells in the stroma can form inclusion cysts (Photo 3) in a micro-environment in which the epithelial cells are subjected to a paracrine influence (hormonal influence through oestrogens and gonadotrophins), or to the action of cytokines such as interleukins 1 and 6, or to the influence of growth factors stimulating cell proliferation.<sup>22–24</sup>

The prevalence of inclusion cysts in dysplastic ovaries ranges from 62 to 75%.<sup>13–15</sup> This prevalence seems to be directly linked to the total duration of ovulation periods. Mittal and colleagues<sup>14</sup> found two to three times more cases of tubal metaplasia in cortical inclusion cysts in ovaries contralateral to ovarian carcinoma than in normal ovaries.

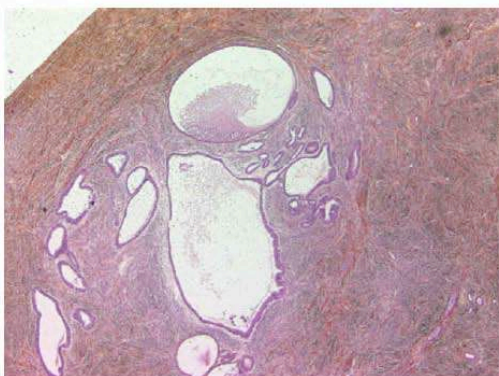
Conversely, inclusion cysts are rarer in normal ovaries, with a prevalence not exceeding 40%.<sup>25</sup> Although these cysts occur in normal ovaries they may not have the same activity potential. A statistically significant increase in Mib 1 (equivalent to Ki67) has been reported in the dysplastic epithelium of ovaries from patients at risk.<sup>19</sup> Coraksi and colleagues<sup>26</sup> found elevated Ki67 expression (between 17 and 25%) in stimulated



**Photo 1 – Cortical invagination and stromal hyperplasia, HES × 20.**



**Photo 2 – Cortical invagination, HES × 2.5.**



**Photo 3 – Epithelial inclusion cysts, HES × 2.5.**

and dysplastic ovaries from rats. Likewise, cortical invaginations have been observed in 41–85% of ovarian dysplasias<sup>13–15</sup> and in up to 21% of normal ovaries.<sup>25</sup>

The incessant ovulation theory is consistent with several epidemiological and experimental studies and, as use of the oral contraceptive pill was confirmed to be protective,<sup>4</sup> ovarian hyperstimulation was thought to increase the risk of ovarian cancer. Although these findings were confirmed by several groups,<sup>27–29</sup> they are nevertheless controversial. Our objective was to examine ovaries removed after hyperstimulation to determine whether histopathological abnormalities are present and are comparable to the dysplastic lesions described in ovaries known to be at high risk (contralateral or genetic).

A similar study was undertaken by Nieto and colleagues and their score system (designed for stimulated ovaries)<sup>8</sup> was therefore used in this study, with additional cytological criteria (inclusion cysts, cortical invaginations, psammoma and stroma hyperplasia) also described in a previous study.<sup>18</sup> This was used to develop a scoring system for excised material from prophylactic ovariectomies performed because of genetic risk.

Our results were comparable to those of Nieto, with a significant presence of abnormalities in stimulated ovaries (7.90 versus 5.7 for Nieto, 7.51 versus 3.62 here).<sup>30</sup> However, the average dysplasia score was lower than that observed in the genetic risk group.

Our findings raise a number of issues. When only patients with the BRCA 1 or 2 mutation were considered, the prophylactic salpingo-oophorectomy score rose to 11.14. This was significantly higher than the score in patients with a family history of ovarian/breast cancer without proven mutation (score 8.1). This finding is of considerable interest, particularly as patients with BRCA mutations in our series had an exposure to protective oral contraception that was nine times longer than patients with a family history only. Ovarian dysplasia in patients with BRCA mutations may be a precancerous lesion phenotype in the light of recent studies which classify ovarian serous carcinoma into low-grade and high-grade<sup>31–33</sup>; this classification considers endometriosis and borderline serous and mucinous tumours to be precursors of low-grade ovarian carcinoma, whereas precursors of high-grade carcinoma include ovarian dysplasias and, as mentioned recently by some authors, dysplasias of the fimbriated portion of the fallopian tube.<sup>34,35</sup>

By separating mutated BRCA patients from non-mutated family history patients in the prophylactic ovariectomy group, the following gradation of ovarian dysplasia score was obtained, which increases according to the supposed increased level of risk:

Score<sup>exposed</sup> (7.51) < Score<sup>OP with ATCD</sup> (8.1) < Score<sup>OP mutated</sup> (11.14).

This gradation, which parallels that of risk, suggests that these lesions may progress towards neoplastic transformation. The dysplasia profile was different in Groups B and C. Tufting, inclusion cysts, psammoma, cortical invaginations and stromal hyperplasia were more frequent and more severe in genetic risk ovaries. Conversely, cellular pleomorphism and increased nucleus/cytoplasm ratio were more frequent in the stimulated ovaries group. Madhavi and colleagues<sup>36</sup> recently proposed a critical reappraisal of the



possible causal link between induction of ovulation and ovarian cancer. Their conclusion, supported by others,<sup>28,37–40</sup> was that there was a significant association between stimulation of ovulation and borderline tumours. These results can be explained by high 'oestrogen receptor' expression in borderline ovaries (oestrogens stimulate cell proliferation in cells containing oestrogen receptors and gonadotrophin receptors can also be detected in experimentally induced ovarian tumours).<sup>36,40–42</sup>

The different profiles of dysplasia (Fig. 1) observed in genetic risk ovaries and stimulated ovaries could partly explain this difference: hyperstimulation may favour a different evolution (perhaps towards borderline tumours), while ovaries at genetic risk may be more prone to invasive cancers.

Clearly, our results should be interpreted with caution as only patients who had undergone ovarian adnexectomy or cystectomy after hyperstimulation were studied. There were no data concerning other stimulated patients and hence the true prevalence of ovarian dysplasia and cancer after stimulation is unknown. It cannot be concluded therefore that hyperstimulation truly increases the risk of neoplasia. However, our observations are consistent with Fathalla's theory. This makes it difficult to estimate risk factors. In addition, our study is purely observational. A series of stimulated ovaries were found that presented dysplastic lesions, but the progression of these lesions cannot be predicted. The profile of these lesions was different from that observed in prophylactic oophorectomies. Further follow-up studies are therefore necessary to assess the progression of these abnormalities.

In conclusion, the results of this study, based on a retrospective analysis of 35 ovaries or ovarian cysts after stimulation compared with 62 controls and 27 prophylactic ovariectomies performed for genetic risk, confirm the presence of a significant number of histopathological abnormalities after stimulation.

Gradation according to risk level (hyperstimulation <family history of breast or ovarian cancer <BRCA 1 or 2 gene mutation) is consistent with progression of this process towards cancer formation, fully justifying the term 'ovarian dysplasia' or 'ovarian intraepithelial neoplasia' for this group of precancerous abnormalities.<sup>43</sup> Immunohistochemical and molecular studies could offer even more insight into early ovarian carcinogenesis and these studies are currently in progress in our institution.<sup>44</sup>

The fact that the dysplasia profile is slightly different between stimulated ovaries and ovaries at genetic risk is also consistent with previous evidence that hyperstimulation might favour a different evolution (possibly towards borderline tumours).

Finally, from a practical point of view, these findings are an alarm signal: their implications are serious enough to justify an interventional attitude in women presenting with clinical or ultrasound ovarian abnormalities several years after ovarian hyperstimulation.

### Conflict of interest statement

None declared.

### Acknowledgement

The authors would like to thank Erwan Floch from Newmed Publishing Services for his help with the English editing of this paper.

### REFERENCES

1. Ahmed FY, Wiltshaw E, Ahern RP, et al. Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1996;**14**:2968–75.
2. Menon U, Skates SJ, Lewis S, Rosenthal AN, Mc Donald N, Jacobs IJ. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2005;**23**:7919–26.
3. Brewer MA, Ranger-Moore J, Baruche A, et al. Exploratory study of ovarian intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**:299–305.
4. Gwinn ML, Lee NC, Rhodes PH, Layde PM, Rubin GL. Pregnancy, breast feeding and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. *J Clin Epidemiol* 1990;**43**:559–68.
5. Wu ML, Whittemore AS, Paffenbarger RS, et al. Personal and environmental characteristics related to epithelial ovarian cancer. Reproductive and menstrual events and oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* 1988;**128**:1216–27.
6. Fathalla M. Incessant ovulation: a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;**2**:163.
7. Deligdisch L, Gil J, Kerner H, Wu HS, Beck D, Gershoni-Baruch R. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. *Cancer* 1999;**86**:1544–50.
8. Nieto JJ, Crow J, Sundaresan M, et al. Ovarian epithelial dysplasia in relation to ovulation induction and nulliparity. *Gynecol Oncol* 2001;**82**:344–9.
9. Gusberg SB, Deligdisch L. Ovarian dysplasia, a study of identical twins. *Cancer* 1984;**54**:1–4.
10. Salazar H, Godwin AK, Daly MB, et al. Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies. *J Natl Cancer Inst* 1996;**88**:1810–20.
11. Plaxe S, Deligdisch L, Dottino P, Cohen C. Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1990;**38**:367–72.
12. Zheng J, Wan M, Zweizig S, Veliescu M, Yu MC, Dubeau L. Histologically benign or low grade malignant tumors adjacent to high grade ovarian carcinomas contain molecular characteristics of high grade carcinomas. *Cancer Res* 1993;**53**:4138–42.
13. Tressera F, Grases PJ, Labastida R, Ubeda A. Histological features of the contralateral ovary in patients with unilateral ovarian cancer: a case control study. *Gynecol Oncol* 1998;**71**:437–41.
14. Mittal KR, Jacquotte AZ, Cooper JL, Demopoulos R. Contralateral ovary in unilateral ovarian carcinoma: a search for preneoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol* 1993;**12**:59–63.
15. Wemess BA, Afify AM, Bielat KL, Eltabbakh GH, Piver MS, Paterson JM. Altered surface and cyst epithelium of ovaries removed prophylactically from women with a family history of ovarian cancer. *Hum Pathol* 1999;**30**:151–7.
16. Stratton JF, Buckley CH, Lowe D, Ponder BAJ. Comparison of prophylactic oophorectomy specimens from carriers and non carriers of a BRCA1 or BRCA2 gene mutation. *J Natl Cancer Inst* 1999;**91**:626–81.
17. Barakat RR, Federici MG, Saigo PE, Robson ME, Offit K, Boyd J. Absence of premalignant histologic, molecular, or cell

- biologic alterations in prophylactic oophorectomy specimen from BRCA1 heterozygotes. *Cancer* 2000;**89**:383–90.
18. Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouëdec G, et al. Ovarian epithelial dysplasia and prophylactic oophorectomy for genetic risk. *Int J Gynecol Cancer* 2009;**19**:65–72.
  19. Schloosshauer PW, Cohen CJ, Penault-Llorca F, et al. Prophylactic oophorectomy. *Cancer* 2003;**98**:2599–606.
  20. Deligdisch L, Gil J. Characterization of ovarian dysplasia by interactive morphometry. *Cancer* 1989;**63**:748–55.
  21. Deligdisch L, Miranda C, Barba J, Gil J. Ovarian dysplasia: nuclear texture analysis. *Cancer* 1993;**72**:3253–7.
  22. Berchuck A, Kohler MF, Boente MP, Rodriguez GC, Whitaker RS, Bast RC. Growth regulation and transformation of ovarian epithelium. *Cancer* 1993;**71**:545–51.
  23. Wong AST, Maines-Bandiera SL, Rosen B, et al. Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. *Int J Cancer* 1999;**81**:180–8.
  24. Wong AST, Auersperg N. Ovarian surface epithelium: family history and early events in ovarian cancer. *Reprod Biol Endoc* 2003;**70**:1–8.
  25. Tok EC, Ertung D, Tataroglu C, Yazici G, Kanat H, Dilek S. Clinicopathologic study of the putative precursor lesions of epithelial ovarian cancer in low-risk women. *Int J Gynecol Cancer* 2006;**16**:501–6.
  26. Corakci A, Filiz S, Caliskan E, Dalcik C, Ozeren S, Dalcik H. The effects of ovulation induction on ovarian epithelium dysplasia scores and Ki67 expression: an experimental study on rats. *Int J Gynecol Cancer* 2005;**15**:866–71.
  27. Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. And the collaborative Ovarian Cancer Group. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancer in white women. *Am J Epidemiol* 1992;**136**:1184–202.
  28. Harris R, Whittemore AS, Itnyre J. And the collaborative Ovarian Cancer Group. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. *Am J Epidemiol* 1992;**136**:1204–11.
  29. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE, Self SG. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med* 1994;**331**:771–6.
  30. Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouëdec G, et al. Ovarian epithelial dysplasia after ovulation induction: time and dose effect. *Human Reprod* 2009;**24**:132–8.
  31. Kurman RJ, Shih IeM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008;**27**:151–60.
  32. Dehari R, Kurman RJ, Logani S, Shih IeM. The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. *Am J Surg Pathol* 2007;**31**:1007–12.
  33. Folkins AK, Jarboe EA, Roh MH, Crum CP. Precursors to pelvic serous carcinoma and their clinical implications. *Gynecol Oncol* 2009;**113**:391–6.
  34. Crum CP, Drapkin R, Kindelberger D, Medeiros F, Miron A, Lee Y. Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clin Med Res* 2007;**5**:35–44.
  35. Carcangiu ML, Radice P, Manoukian S, et al. Atypical epithelial proliferation in fallopian tubes in prophylactic salpingo-oophorectomy from BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers. *Int J Gynecol Pathol* 2004;**23**:35–40.
  36. Mahdavi A, Pejovic T, Nezhat F. Induction of ovulation and ovarian cancer: a critical review of the literature. *Fertil Steril* 2006;**85**:819–26.
  37. Ness RB, Cramer DW, Goodman MT. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* 2002;**155**:217–24.
  38. Shushan A, Paltiel O, Iscovich J, Elchalal U, Peretz Y, Schenker JG. Human menopausal gonadotrophin and risk of epithelial ovarian cancer. *Fertil Steril* 1996;**65**:13–8.
  39. Parazzini F, Negri E, La Vecchia C, et al. Treatment for infertility and risk of ovarian tumors of borderline malignancy. *Gynecol Oncol* 1998;**68**:226–8.
  40. Sushan A, Paltiel O, Schenker JG. Induction of ovulation and borderline ovarian cancer-the hormonal connection? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;**85**:1–4.
  41. Cinton GM, Hua W. Estrogen action in human ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997;**25**:1–9.
  42. Garg PP, Kerlikowske K, Subak L, Grady D. Hormone replacement therapy and the risk of epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998;**92**:472–9.
  43. Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouëdec G, et al. Ovarian epithelial dysplasia: myth or reality? *Review Gynecol Obstet Fertil* 2008;**36**:800–7.
  44. Jongsma APM, Piek JMJ, Zweemer RP, et al. Molecular evidence for putative tumour suppressor genes on chromosome 13q specific to BRCA1 related ovarian and fallopian tube cancer. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2002;**55**:305–9.


## **Article 5:**

**Chene G**, Dauplat J, Raoelfils, I Bignon Y J, Cayre A, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pomel C Penault-Llorca F. Echelle d'évaluation de la dysplasie épithéliale de l'ovaire. *Sous presse. Annal Pathol* 2011, IF=0.5

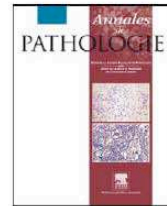
Cet article décrit les échelles d'évaluation histopathologique de la dysplasie et propose un cut off.





Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
 EM|consulte  
www.em-consulte.com



ARTICLE ORIGINAL

## Échelle d'évaluation de la dysplasie épithéliale de l'ovaire

Ovarian epithelial dysplasia: Description of a dysplasia scoring scheme

Gautier Chene<sup>a,\*,b,c,d</sup>, Jacques Dauplat<sup>a</sup>,  
Ines Raoelfils<sup>b</sup>, Yves-Jean Bignon<sup>d</sup>,  
Anne Cayre<sup>b</sup>, Patricia Jaffeux<sup>e</sup>,  
Bruno Aublet-Cuvelier<sup>e</sup>, Christophe Pomel<sup>a</sup>,  
Frédérique Penault-Llorca<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Département de chirurgie, centre Jean-Perrin, 58, rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> Département d'anatomopathologie, centre Jean-Perrin, 58, rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup> Département de gynécologie-obstétrique et médecine de la reproduction, hôpital Nord, CHU de Saint-Étienne, université de Saint-Étienne–Jean-Monnet, 42000 Saint-Étienne, France

<sup>d</sup> Département d'oncologie moléculaire, centre Jean-Perrin, 58, rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>e</sup> Département d'informations médicales, hôpital Gabriel-Montpied, CHU de Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France

Accepté pour publication le 11 octobre 2010  
Disponible sur Internet le 26 janvier 2011

### MOTS CLÉS

Dysplasie de l'ovaire ;  
Ovariectomie  
prophylactique ;  
Cancer de l'ovaire

### Résumé

**Introduction.** – L'analyse méticuleuse histopathologique des pièces d'ovariectomies prophylactiques réalisées en cas de risque génétique avéré (mutation BRCA) ou de prédisposition héréditaire (lourds antécédents familiaux) peut révéler des anomalies qualifiées de « dysplasie épithéliale de l'ovaire ». L'objectif de cette étude est de donner une description morphologique complète à l'aide d'une échelle d'évaluation originale et de déterminer le *cut-off* à partir duquel le diagnostic de dysplasie peut être posé.

**Patientes et méthode.** – Le profil morphologique de 35 ovariectomies prophylactiques (groupe A) et de 90 ovariectomies témoins (groupe B) a été comparé à l'aide d'une échelle comportant 11 critères histopathologiques avec deux niveaux de sévérités pour chacun. Toutes les lames ont été relues en insu par deux pathologistes spécialisées en oncogynécologie.

**Résultats.** – Le score moyen de dysplasie était significativement plus élevé dans le groupe A (9,0 versus 3,5,  $p < 0,001$ ). Nous avons observé une gradation au sein de ce groupe avec un score de dysplasie plus sévère pour les ovaires mutés que pour les ovaires non mutés (11,6 pour BRCA

\* Auteur correspondant.  
Adresse e-mail : [chenegautier@yahoo.fr](mailto:chenegautier@yahoo.fr) (G. Chene).

## KEYWORDS

Ovarian dysplasia;  
Prophylactic  
oophorectomy;  
Ovarian cancer

1 ; 7,6 pour BCRA 2 ; 7,1 pour antécédents familiaux). À l'aide d'une courbe Receiver Operating Characteristics (ROC), la valeur seuil minimale pour laquelle il existe une différence significative a été évaluée à 8 (sensibilité : 60 % ; spécificité : 93,3 %).

**Conclusion.** — L'augmentation du score de dysplasie chez les ovariectomies prophylactiques ainsi que la gradation de la dysplasie au sein de ce groupe est concordante avec le caractère pré-invasif de la dysplasie. Cela souligne également l'importance de l'utilisation d'une échelle d'évaluation de la dysplasie afin de caractériser au mieux l'ensemble de ces anomalies histopathologiques.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

## Summary

**Introduction.** — Precancerous ovarian epithelial dysplasia was first described after prophylactic oophorectomy (OP) for genetic risk (BRCA mutation) or because of a strong family history of ovarian and/or breast cancer. The objective of this study was to describe histopathological features of ovarian dysplasia and to propose a dysplasia scoring scheme with a cut-off.

**Patients and method.** — One hundred and twenty-five bilateral oophorectomies (genetic predisposition:  $n = 35$  and control group:  $n = 90$ ) were reviewed by two pathologists blinded to clinical data. Eleven epithelial cytological and architectural features were studied and an ovarian dysplasia score was defined to compare the degree of ovarian epithelial abnormalities between the two groups.

**Results.** — Mean ovarian dysplasia score was significantly higher in prophylactic oophorectomy group than in control group (9.0 versus 3.5,  $P < 0.001$ ). Dysplasia was more severe in OP with BRCA mutation than in OP without (11.6 in BRCA 1 ; 7.6 in BRCA 2 ; 7.1 in family history). The cut off for dysplasia was 8 with a sensitivity of 60% and a specificity of 93.3%.

**Conclusion.** — The increased dysplasia score in OP and the gradation in dysplastic severity in OP with proven BRCA mutations may suggest that ovarian dysplasia could be a pre-malignant non invasive histopathological lesion. The 11 cytological and architectural features in the dysplasia scoring scheme could be a useful tool to study ovarian dysplasia.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Introduction

Les deux facteurs de risque de néoplasie ovarienne les plus fréquemment évoqués sont la prédisposition héréditaire et « l'ovulation incessante » [1]. En 1971, Fathalla [1], constatant la fréquence plus importante du cancer de l'ovaire chez les nullipares, a émis l'hypothèse que l'ovulation pouvait être à l'origine de la transformation maligne de l'épithélium ovarien. En effet, chaque ovulation crée un traumatisme mineur sous forme d'une rupture au niveau de la surface épithéliale. Au cours du processus de cicatrisation, des kystes d'inclusion d'épithélium ovarien peuvent se former dans le stroma et ainsi, soumis à des facteurs de croissance cellulaires ou hormonaux, être à l'origine d'une prolifération puis de la transformation néoplasique [2].

Même si la carcinogenèse ovarienne requiert probablement un certain nombre de mutations génétiques pour acquérir des propriétés malignes et d'expansion clonale, l'épithélium de surface de l'ovaire et les kystes d'inclusion résultant de l'ovulation pourraient jouer un rôle prépondérant dans la dégénérescence maligne. Bien que l'aspect macroscopique des pièces d'ovariectomies prophylactiques soit bien souvent normal, l'examen anatomopathologique attentif de l'ensemble de l'ovaire est susceptible de mettre en évidence ces modifications cytologiques et architecturales fines dénommées « dysplasie ovarienne » [3].

Nous proposons une description histopathologique des lésions dysplasiques mises en évidence sur les pièces d'ovariectomie prophylactique à l'aide d'une échelle originale d'évaluation de la dysplasie. Nous proposons également de déterminer un seuil quantitatif ou *cut-off* de dysplasie qui pourra aider le pathologiste dans le diagnostic de dysplasie.

## Patientes et méthode

### Patientes

À partir d'une base de données regroupant 1600 annexectomies ovariennes réalisées entre janvier 1990 et décembre 2005, nous avons sélectionné deux groupes de patientes :

- groupe A : annexectomies prophylactiques pour risque génétique (mutation BRCA 1 ou 2) ou antécédents familiaux importants de néoplasie sein/ovaires. Nous avons défini ces antécédents familiaux de la manière suivante :
  - au moins un cancer de l'ovaire familial au premier degré et au moins un cancer du sein familial au premier ou deuxième degré et/ou un cancer personnel du sein,
  - au moins deux cancers du sein familiaux au premier ou deuxième degré et un antécédent personnel de cancer du sein,
  - recherche négative des mutations BRCA 1 et 2 ;
- groupe B : annexectomies chez un groupe témoin spontanément fertile et sans antécédent personnel ou familial de cancers gynécologiques (sein, ovaire, endomètre) et dont l'examen histopathologique concluait à des ovaires dénués de pathologie cancéreuse ou *borderline*. Dans le but de diminuer le facteur confondant représenté par l'exposition à la contraception orale, nous avons retenu les patientes ayant choisi un mode de contraception non hormonal.

### Critères histopathologiques

Notre définition d'atypies ovariennes se base sur les précédentes études de dysplasie ovarienne, à savoir, la dysplasie

décrite dans les ovaires à risque génétique (ovariectomie prophylactique pour mutation BRCA 1 ou 2) [4–6], dans les zones « saines » adjacentes à un cancer de l'ovaire [7,8], dans l'ovaire controlatéral « d'allure saine » à un cancer de l'ovaire unilatéral [9,10] et dans les ovaires stimulés [11]. Afin que la méthodologie soit reproductible, nous avons retenu 11 critères histopathologiques évalués lors de précédentes études, à la fois sur les ovaires à risque génétique et les ovaires stimulés [12,13] :

- pseudostratification épithéliale (Pse) ;
- prolifération épithéliale (Pe) ;
- papillomatose de surface (Ps) ;
- irrégularité de la chromatine nucléaire (Ichn) ;
- irrégularité du contour nucléaire (Icn) ;
- pléiomorphisme cellulaire (Pc) ;
- taille nucléaire (augmentée ou non) (Tn) ;
- kystes d'inclusion (Ki) ;
- invaginations épithéliales profondes (Iep) ;
- psammomes (P) ;
- hyperplasie stromale (Hs).

Dans chaque cas, la zone la plus anormale était cotée de 0 à 2 (0 = normal, 1 = modérément anormal, 2 = sévèrement anormal), qu'elle soit localisée à la surface ou au niveau d'un kyste d'inclusion.

Un score de dysplasie pour chaque patiente est simplement obtenu en ajoutant les niveaux de chacun des 11 items (0 à 22).

La validation de cette échelle sera expliquée dans la discussion.

Les lames histopathologiques des 35 ovariectomies prophylactiques et des 90 témoins ont toutes été relues en insu par deux pathologistes experts en oncogynécologie. Quand plusieurs lames étaient disponibles, celle présentant le score de dysplasie le plus élevé était retenue.

En cas de divergence manifeste entre les scores établis par chaque pathologiste, une nouvelle relecture collégiale était réalisée afin d'obtenir un consensus.

## Analyse statistique

Notre principale mesure concerne le score moyen de dysplasie.

La comparaison de moyenne est réalisée par le test de Student. Le seuil ou *cut-off* de dysplasie (score à partir duquel la dysplasie est statistiquement significative par rapport à la population témoin) sera déterminé à l'aide d'une courbe Receiver Operating Characteristics (ROC).

## Résultats

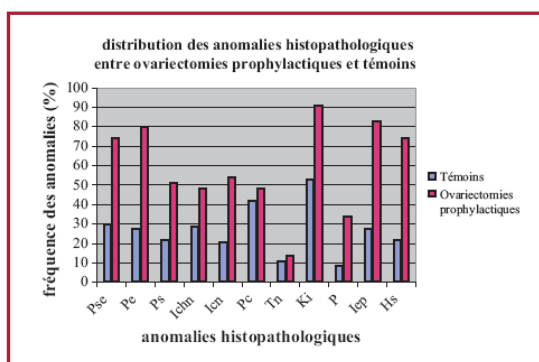
Le groupe A est constitué de 13 mutations BRCA 1, huit mutations BRCA 2 et 14 ATCD familiaux (sans mutation associée). Notre population témoin comporte 90 patientes. Les données démographiques sont rappelées dans le [Tableau 1](#).

Les anomalies histopathologiques les plus représentatives du groupe des ovariectomies prophylactiques comportent les kystes d'inclusion (91,4%), les invaginations épithéliales profondes (82,8%), la prolifération épithéliale (80%), la pseudostratification épithéliale (74,3%) et l'hyperplasie stromale (74,2%) (cf. iconographie).

Les anomalies sont généralement plus marquées au niveau des ovaires avec mutation BRCA. Elles sont autant présentes en ce qui concerne les kystes d'inclusion,

**Tableau 1** Caractéristiques du groupe A ovariectomie prophylactique (n = 35) et du groupe B témoin (n = 90). *Characteristics of the prophylactic ovariectomy group (group A, n = 35) and control group (group B, n = 90).*

Variables/groupes	Témoins, n = 90	Ovariectomies prophylactiques, n = 35
Âge	47,8 ± 5,5 (32–61)	52,0 ± 6,8 (37–63)
Parité	2,2 ± 1,0 (0–5)	1,4 ± 1,0 (0–4)
Contraception orale		
Oui	78 (86,7%)	23 (65,7%)
Durée (mois)	54,1 ± 22,8	79,2 ± 64,7



**Figure 1.** Distribution des anomalies histopathologiques entre le groupe A ovariectomies prophylactiques et groupe B témoins *Distribution of histopathological abnormalities in the prophylactic ovariectomy group (group A) and control group (group B).*

les invaginations épithéliales profondes (différences non significatives) et la taille nucléaire.

Les anomalies histopathologiques chez les témoins sont plus rares, sauf pour les kystes d'inclusion, présents dans 53,3% des cas ([Tableau 2](#) et [Fig. 1](#)).

À partir de ces données, un score moyen de dysplasie est calculé pour le groupe des ovariectomies prophylactiques en faisant la moyenne du score de chaque patiente. Le score moyen de dysplasie des ovariectomies prophylactiques est de 9,0.

Le score moyen de dysplasie du groupe témoin est de 3,5.

Le score moyen de dysplasie est significativement plus élevé dans la population d'ovariectomie prophylactique par rapport au groupe témoin (9,0 versus 3,5,  $p < 0,0001$ ). La distinction entre mutation BRCA 1 (11,6), BRCA 2 (7,6) et antécédents (7,1) retrouve un profil de dysplasie plus sévère en cas de mutation BRCA.

*Le score moyen de dysplasie du groupe des mutations BRCA (BRCA 1 + BRCA 2) est statistiquement significatif par rapport au score des antécédents sans mutation associée (respectivement 10,9 versus 7,1,  $p < 0,0002$ ).*

Le seuil minimal de dysplasie (*cut-off* de dysplasie) calculé à partir de la courbe ROC s'élève à 8 (sensibilité : 60% ; spécificité : 93,3%) ([Fig. 2](#)).

**Tableau 2** Distribution des anomalies histopathologiques dans le groupe A ovariectomies prophylactiques ( $n=35$ ) et B témoins ( $n=90$ ).

*Distribution of histopathological abnormalities in the prophylactic ovariectomy group (group A) and control group (group B).*

Critères histopathologiques	Ovariectomies prophylactiques (groupe A) $n=35$ $n^{BRCA+}=21$ $n^{BRCA-}=14$	Témoins, $n=90$ (groupe B)
Pseudostratification épithéliale (Pse)	26 (74,3 %) BRCA+ : 16 (76,2 %) BRCA- : 10 (71,4 %)	27 (30 %)
Prolifération épithéliale (Pe)	28 (80 %) BRCA+ : 17 (80,9 %) BRCA- : 11 (78,5 %)	25 (27,7 %)
Papillomatose de surface (Ps)	18 (51,4 %) BRCA+ : 11 (52,3 %) BRCA- : 7 (50 %)	20 (22,2 %)
Irrégularité de la chromatine nucléaire (Ichn)	17 (48,5 %) BRCA+ : 14 (66,6 %) BRCA- : 3 (21,4 %)	26 (28,8 %)
Irrégularité du contour nucléaire (Icn)	(54,2 %) BRCA+ : 16 (76,2 %) BRCA- : 3 (21,4 %)	19 (21,1 %)
Pléiomorphisme cellulaire (Pc)	(48,5 %) BRCA+ : 12 (57,1 %) BRCA- : 5 (35,7 %)	38 (42,2 %)
Taille nucléaire (Tn)	5 (14,2 %) BRCA+ : 3 (14,2 %) BRCA- : 2 (14,2 %)	10 (11,1 %)
Kystes d'inclusion (Ki)	(91,4 %) BRCA+ : 19 (90,4 %) BRCA- : 13 (92,8 %)	48 (53,3 %)
Psammomes (P)	(34,2 %) BRCA+ : 9 (42,8 %) BRCA- : 3 (21,4 %)	8 (8,8 %)
Invaginations épithéliales profondes (Iep)	(82,8 %) BRCA+ : 17 (80,9 %) BRCA- : 12 (85,7 %)	25 (27,7 %)
Hyperplasie stromale (Hs)	(74,2 %) BRCA+ : 17 (80,9 %) BRCA- : 9 (64,2 %)	20 (22,2 %)

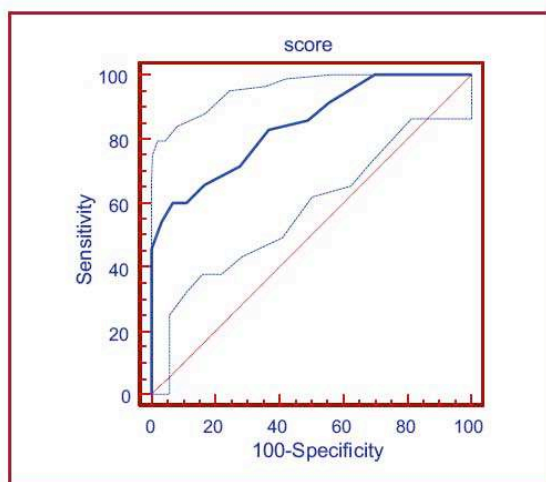
Dans la colonne du groupe A ovariectomies prophylactiques, la première ligne correspond à toute la population du groupe A ( $n=35$ ), la deuxième ligne correspond aux patientes porteuses de mutations BRCA ( $n=21$ ) et la troisième ligne correspond aux patientes non mutées ( $n=14$ ). Entre parenthèse, est noté le pourcentage correspondant.  
*For the group A, we can see all the population ( $n=35$ ) in the first line, only BRCA mutations patients ( $n=21$ ) in the second line, and patients without BRCA mutation in the third line ( $n=14$ ).*

## Discussion

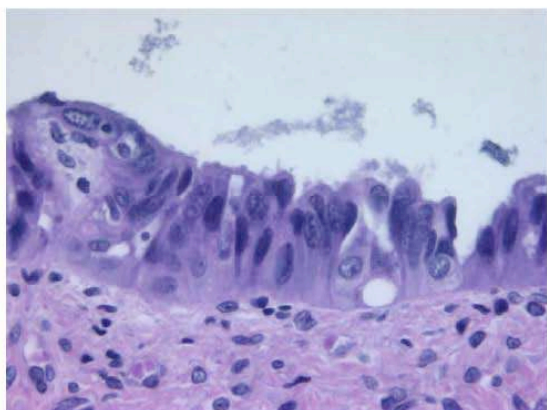
La dysplasie ovarienne a été initialement décrite au niveau des ovaires à risque génétique de cancer [14,15]. L'analyse microscopique des pièces d'annexectomie prophylactique de jumelles monozygotes dont l'une était porteuse d'un cancer de l'ovaire a révélé des anomalies cytologiques et architecturales (papillomatose de surface, kystes d'inclusion, pléiomorphisme nucléaire, pseudostratification épithéliale et invaginations épithéliales) [3]. Par analogie aux lésions pré-invasives cervicales, le terme générique de « dysplasie » a été proposé (Fig. 3–7).

Par la suite, différents auteurs ont rapporté des anomalies similaires au niveau d'ovaires à risque génétique statistiquement significatif par rapport à des populations témoins exempts de risque de cancer gynécologique [4,5]. Le fait que ces ovaires pouvaient évoluer vers le cancer en l'absence d'ovariectomie prophylactique a fait alors considérer la dysplasie épithéliale de l'ovaire comme le chaînon précédant la néoplasie. L'explication physiopathologique se baserait sur la théorie de l'ovulation incessante de Fathalla [1] : au cours du processus de cicatrisation de l'ovulation peuvent se former des invaginations épithéliales profondes qui donneront naissance à des kystes d'inclusion.

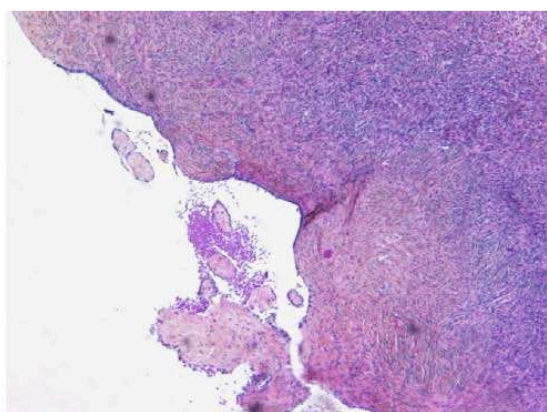




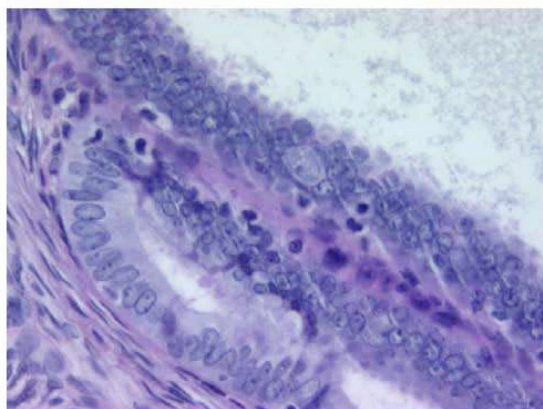
**Figure 2.** Courbe Receiver Operating Characteristics (ROC) : seuil de dysplasie à 8 (sensibilité: 60%; spécificité: 93,3%).  
Receiver operating characteristics curve (ROC): dysplasia cut-off= 8 (Se: 60%; Sp: 93.3%).



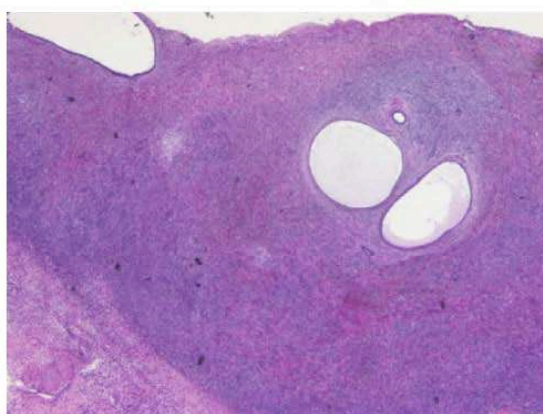
**Figure 3.** Pseudostratification épithéliale et anomalies nucléaires, HES x 40.  
Epithelial multilayering and nuclear atypia, HES x 40.



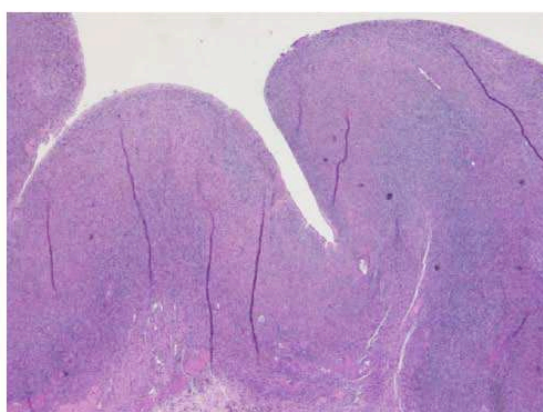
**Figure 4.** Papillomatose de surface, HES x 5.  
Surface papillomatosis, HES x 5.



**Figure 5.** Pléiomorphisme cellulaire et anomalies nucléaires, HES x 40.  
Cellular pleomorphism and nuclear atypia, HES x 40.



**Figure 6.** Kystes d'inclusion au sein d'un stroma hyperplasique, HES x 2,5.  
Epithelial inclusion cyst and stromal hyperplasia, HES x 2.5.



**Figure 7.** Invaginations épithéliales profondes, HES x 2,5.  
Cortical invagination.

Les cellules épithéliales recouvrant les kystes peuvent se différencier et revêtir des caractéristiques müllériennes (métaplasie müllérienne).

*Sous l'influence hormonale stromale et sous l'effet de cellules pro-inflammatoires (macrophages, monocytes), de cytokines et peut-être de cellules souches pluripotentes, surviendrait la transformation maligne [2,16,17].*

Nos résultats illustrent d'ailleurs ce schéma physiopathologique puisque la fréquence des kystes d'inclusion, invaginations profondes et hyperplasie stromale apparaît prépondérante dans le groupe A (ovariectomies prophylactiques).

Des lésions dysplasiques équivalentes ont également été mises en évidence au niveau de l'ovaire « sain » controlatéral à un cancer de l'ovaire unilatéral [7,8]. En se basant sur l'argument démontré que le cancer de l'ovaire est bilatéral dans plus de 50 % des cas, la dysplasie semblait donc être un élément clé dans la compréhension de la carcinogenèse ovarienne. De même, des stigmates histopathologiques significatifs à type de modifications architecturales, cellulaires et nucléaires étaient mises en évidence sur des zones d'allure saines adjacentes à un cancer de l'ovaire [9,10].

Plus récemment ont été mises en évidence des lésions similaires ovariennes qualifiées de dysplasie au niveau des ovaires stimulés au cours de protocoles de FIV. Nieto et al. [11] ont, les premiers, retrouvé des anomalies significatives au niveau d'ovaires stimulés par rapport à une population témoin et à une population de patientes nullipares. Une de nos précédentes études a confirmé ces données en montrant en plus l'existence probable d'un effet-temps et d'un effet-dose [12] : les anomalies histopathologiques seraient d'autant plus sévères et nombreuses qu'il y a de cycles de stimulation (> 3) et après un délai suffisamment long (plus de sept années). Il semble cependant que le profil de dysplasie des ovaires stimulés soit différent de celui des ovaires à risque génétique, ce qui irait dans le sens d'une évolution différente : le cancer pour les ovaires à risque génétique (mutation BRCA 1 ou 2), et probablement les tumeurs *borderlines* pour les ovaires stimulés (protocoles de stimulation en Assistance médicale à la procréation) si l'on en croit les dernières séries épidémiologiques de suivi de patientes infertiles [18–20].

Pour autant, les modifications histopathologiques caractéristiques de dysplasie sont difficiles à déterminer : il s'agit d'anomalies cytologiques et architecturales subtiles, basées sur une évaluation subjective du pathologiste, ce qui a rendu fondamental l'établissement de scores [21].

Plusieurs échelles de mesure ont été décrites :

- le score de Salazar et al. [4], basé sur la présence d'au moins trois des critères suivants : kystes d'inclusion, pseudostratification épithéliale, papillomatose de surface, invaginations profondes, hyperplasie stromale. La sensibilité serait de 75 %, la spécificité de 90 %. La sensibilité augmenterait à 85 % si l'on considère seulement deux critères ;
- le score de Plaxe et al. [8] considère comme nécessaire et suffisant la présence des quatre critères suivants pour affirmer le diagnostic de dysplasie de l'ovaire avec une sensibilité de 98 % et une spécificité de 100 % : perte de polarité, stratification épithéliale, pléiomorphisme cellulaire et distribution irrégulière de la chromatine ;

Ces deux échelles d'évaluation de la dysplasie ont l'avantage d'être simples mais l'inconvénient majeur d'être incomplètes (aucun critère nucléaire pour Salazar et al. [4], et aucun critère basé sur la physiopathologie de la dysplasie comme kystes d'inclusion, invaginations épithéliales profondes et hyperplasie stromale pour Plaxe et al. [8]) et de ne pas faire état de la sévérité de chacune des anomalies (échelles d'évaluation uniquement qualitatives).

- le score de Nieto et al. [11], décrit pour la dysplasie des ovaires stimulés, a l'avantage d'être à la fois qualitatif (basé sur neuf critères cytologiques et nucléaires) et quantitatif (basé sur deux niveaux de sévérité). Pourtant, ce score ne tient pas compte des kystes d'inclusion, invaginations épithéliales profondes et hyperplasie stromale, alors que ces critères apparaissent pourtant fondamentaux dans la physiopathologie de la dysplasie. Par ailleurs, aucun seuil de dysplasie n'est défini ;
- le score de Clermont-Ferrand : notre score reprend l'ensemble des items décrits dans les études précédentes [12,13] afin d'obtenir un score exhaustif (11 critères histopathologiques) et reproductible (Tableau 3). Il offre à la fois une description cytologique et architecturale de la dysplasie (analyse qualitative) et permet aussi une évaluation quantitative grâce à deux niveaux de sévérité des anomalies. La pertinence métrologique de cette échelle est démontrée par la reproductibilité, la concordance des résultats lors de l'analyse par différents pathologistes et la validité clinicopathologique. Nous avons utilisé ce score pour caractériser la dysplasie au niveau des ovaires à risque génétique [13] ainsi qu'au niveau des ovaires stimulés [12]. Dans les deux cas, le score moyen de dysplasie était significatif par rapport à une population témoin, avérant la présence de dysplasie. Dans notre étude actuelle concernant une série plus large d'ovariectomies prophylactiques, nous retrouvons un score de dysplasie de 9,0 et des anomalies histopathologiques significativement plus marquées par rapport aux témoins. La différence de profils de dysplasie entre ovaires mutés BRCA 1, BRCA 2 et antécédents familiaux justifie l'utilisation exhaustive des 11 critères de notre échelle (intérêt de la description qualitative). De plus, cette gradation significative des ovaires mutés par rapport aux ovaires avec antécédents (dysplasie d'autant plus sévère que le risque de cancer est important : 11,6 pour BRCA 1, 7,6 pour BRCA 2 et 7,1 pour antécédents familiaux) confirme sans nul doute le caractère pré-invasif de la dysplasie, d'une part, et, d'autre part, l'intérêt d'une échelle d'évaluation quantitative avec les deux niveaux de sévérité.

Pourtant, certains travaux ne retrouvent pas d'anomalies dysplasiques significatives au niveau d'ovariectomies prophylactiques [5,6,22]. Ainsi, Werness et al. en 1999 [5] retrouvaient une augmentation isolée du nombre de kystes d'inclusion dans son étude réalisée en insu sur 64 annexectomies prophylactiques de patientes à haut risque par rapport à 30 témoins. Les autres anomalies telles que papillomatose ou hyperplasie stromale n'étaient pas retrouvées avec une fréquence accrue. D'une part, les résultats négatifs de ces études peuvent être imputés à des problèmes techniques, car les ovaires n'ont probablement pas été examinés dans leur totalité : la manipulation des pièces opératoires est délicate, source de fréquents traumatismes de l'épithélium de surface, fin et fragile, empêchant une analyse histopathologique complète.



**Tableau 3** Comparaison des différentes échelles de dysplasie ovarienne existant dans la littérature.  
*Comparison of the different scoring scheme of ovarian epithelial dysplasia.*

	Score décrit dans les ovaires à risque génétique (ovariectomie prophylactique) [4–6]	Score décrit dans les zones « saines » adjacentes à un cancer de l'ovaire [7,8]	Score décrit dans l'ovaire controlatéral « sain » à un cancer de l'ovaire unilatéral [9,10]	Score décrit dans les ovaires stimulés par Nieto et al. [11]	Le score de Clermont-Ferrand [12,13]
Pseudostratification épithéliale	✓	✓	✓	✓	✓
Prolifération épithéliale				✓	✓
Anomalies nucléaires		✓	✓	✓	✓
Pléiomorphisme cellulaire		✓		✓	✓
Papillomatose de surface	✓		✓		✓
Kystes d'inclusion	✓		✓		✓
Psammomes	✓		✓		✓
Invaginations épithéliales profondes	✓		✓		✓
Hyperplasie stromale	✓		✓		✓

D'autre part, l'analyse de Werness et al. [5] révélait en fait une modification importante : des anomalies nucléaires sous forme d'une irrégularité des contours, et surtout la présence d'une chromatine hétérogène et plus dense que les témoins. Deligdisch et al. [23] confirmaient ces anomalies grâce à l'analyse morphométrique nucléaire : 77,6% des ovaires de descendants juifs ashkénazes (connus pour la fréquence des mutations BRCA 1) contenaient des anomalies nucléaires significatives : taille importante du noyau, distribution hétérogène de la chromatine. Ces données confirment la difficulté diagnostique de la dysplasie ovarienne et devraient inciter à un examen minutieux et exhaustif avec la recherche de l'ensemble des critères décrits par notre échelle.

L'établissement d'une courbe ROC est un outil graphique qui, par le calcul de l'aire sous la courbe, permet d'établir la valeur seuil minimale ayant une différence statistiquement significative avec les témoins et permet ainsi de s'affranchir d'un groupe témoin : ce *cut-off* s'élève à 8 dans notre série. L'idéal serait d'obtenir une sensibilité et une spécificité égales à 1, ce qui n'est généralement pas possible car les deux paramètres varient en sens inverse. Nous avons volontairement choisi de privilégier une spécificité élevée afin de ne pas conclure au diagnostic de dysplasie pour des ovaires normaux non dysplasiques. Autrement dit, en se basant sur notre échelle, la mise en évidence d'un score supérieur à 8 permettrait le diagnostic de dysplasie et, dans tous les cas, devrait alerter le pathologiste.

Les autres méthodes diagnostiques de dysplasie de l'ovaire sont pour l'instant non applicables en pratique courante et restent du domaine de la recherche (analyse morphométrique et caryométrique) [23–26]. Le profil immunohistochimique des tissus ovariens dysplasiques n'est pas non plus d'actualité puisque les résultats apparaissent contradictoires en fonction des études et manquent de spécificité (notamment pour le Ki67 et p53) [27–29].

Enfin, en se basant sur la théorie récente de l'interaction de la trompe dans la cancérogenèse ovarienne, l'étude de la dysplasie tubaire pourrait apporter des éléments supplémentaires (travaux actuellement en cours dans notre département) [28–30].

## Conclusion

Cette étude offre une description histopathologique des lésions dysplasiques mises en évidence sur les pièces d'ovariectomie prophylactique (ovaires à risque génétique et ovaires avec lourds antécédents familiaux) à l'aide d'une échelle d'évaluation de la dysplasie. Cette échelle a l'avantage d'être à la fois qualitative (description des profils de dysplasie basés sur 11 critères histopathologiques) et quantitative (basée sur deux niveaux de sévérité). Le seuil de dysplasie minimal proposé ( $\geq 8$ ) pourra aider le pathologiste dans le difficile et subtil diagnostic de dysplasie épithéliale de l'ovaire.

## Conflit d'intérêt

Aucun.

## Références

- [1] Fathalla M. Incessant ovulation: a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;2:163.
- [2] Fleming JS, Beaufie CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Mol Cell Endocrinol* 2006;247:4–21.
- [3] Gusberg SB, Deligdisch L. Ovarian dysplasia, a study of identical twins. *Cancer* 1984;54:1–4.
- [4] Salazar H, Godwin AK, Daly MB, Laub PB, Hogan M, Rosenblum N, et al. Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1810–20.
- [5] Werness BA, Afify AM, Bielat KL, Eltabbakh GH, Piver MS, Paterson JM. Altered surface and cyst epithelium of ovaries removed prophylactically from women with a family history of ovarian cancer. *Hum Pathol* 1999;30:151–7.
- [6] Stratton JF, Buckley CH, Lowe D, Ponder BAJ. Comparison of prophylactic oophorectomy specimens from carriers and non carriers of a BRCA1 or BRCA2 gene mutation. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(7):626–8.
- [7] Resta L, Russo S, Colucci GA, Prat J. Morphologic precursors of ovarian epithelial tumors. *Obstet Gynecol* 1993;82:181–6.

- [8] Plaxe S, Deligdisch L, Dottino P, Cohen C. Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1990;38:367–72.
- [9] Mittal KR, Jacquotte AZ, Cooper JL, Demopoulos R. Contralateral ovary in unilateral ovarian carcinoma: a search for preneoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12:59–63.
- [10] Tressera F, Grases PJ, Labastida R, Ubeda A. Histological features of the contralateral ovary in patients with unilateral ovarian cancer: a case control study. *Gynecol Oncol* 1998;71:437–41.
- [11] Nieto JJ, Crow J, Sundaresan M, Constantinovici N, Perret CW, Mc Lean AN, et al. Ovarian epithelial dysplasia in relation to ovulation induction and nulliparity. *Gynecol Oncol* 2001;82:344–9.
- [12] Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Mishellany F, Dauplat MM, Jaffeux P, et al. Ovarian epithelial dysplasia after ovulation induction: time and dose effect. *Human Reprod* 2009;24:132–8.
- [13] Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Mishellany F, Dauplat MM, Jaffeux P, et al. Ovarian epithelial dysplasia and prophylactic oophorectomy for genetic risk. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:65–72.
- [14] Deligdisch L, Gil J, Kerner H, Wu HS, Beck D, Gershoni-Baruch R. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. *Cancer* 1999;86:1544–50.
- [15] Deligdisch L. Ovarian dysplasia: a review. *Int J Gynecol Cancer* 1997;7:89–94.
- [16] Auersperg N, Ota T, Mitchell GWE. Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:691–703.
- [17] Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:717–21.
- [18] Dauplat J, Chene G, Pomel C, Dauplat MM, Le Bouedec G, Mishellany F, et al. Comparison of dysplasia profiles in stimulated ovaries and in those with a genetic risk for ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2009;45:2977–83.
- [19] Shushan A, Paltiel O, Iscovitch J, Elchalal U, Peretz Y, Schenker JG. Human menopausal gonadotropin and risk of epithelial ovarian cancer. *Fertil Steril* 1996;65:13–8.
- [20] Mahdavi A, Pejovic T, Nezhat F. Induction of ovulation and ovarian cancer: a critical review of the literature. *Fertil Steril* 2006;85:819–26.
- [21] Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Mishellany F, Dauplat MM, Tardieu AS, et al. Ovarian epithelial dysplasia: myth or reality? Review. *Gynecol Obstet Fertil* 2008;36:800–7.
- [22] Barakat RR, Federici MG, Saigo PE, Robson ME, Offit K, Boyd J. Absence of premalignant histologic, molecular, or cell biologic alterations in prophylactic oophorectomy specimen from BRCA1 heterozygotes. *Cancer* 2000;89:383–90.
- [23] Deligdisch L, Gil J, Kerner H, Wu HS, Beck D, Gershoni-Baruch R. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. Cytogenetic and morphometric correlations. *Cancer* 1999;86:1544–50.
- [24] Deligdisch L, Gil J. Characterization of ovarian dysplasia by interactive morphometry. *Cancer* 1989;63:748–55.
- [25] Deligdisch L, Miranda C, Barba J, Gil J. Ovarian dysplasia: nuclear texture analysis. *Cancer* 1993;72:3253–7.
- [26] Brewer MA, Ranger-Moore J, Baruche A, Alberts DS, Greene M, Thompson D, et al. Exploratory study of ovarian intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:299–305.
- [27] Schloosshauer PW, Cohen CJ, Penault-Llorca F, Miranda CR, Bignon YJ, Dauplat J, et al. Prophylactic oophorectomy. *Cancer* 2003;98:2599–606.
- [28] Leunen K, Legius E, Moerman P, Amant F, Neven P, Vergote I. Prophylactic salpingo-oophorectomy in 51 women with familial breast-ovarian cancer: importance of fallopian tube dysplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:183–8.
- [29] Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP. Dysplastic changes in prophylactic removed fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol* 2001;195:451–6.
- [30] Crum CP, Drapkin R, Kindelberger D, Medeiros F, Miron A, Lee Y. Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clin Med Res* 2007;5:35–44.



## **Article 6 :**

**Chene G**, Dauplat J, Raoelfils I, Bignon Y J, Cayre A, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Penault-Llorca F. Do not forget Fallopian tubes : about tubal dysplasia. **Gynecol Obstet Fertil. 2010, article accepté**

Cet article décrit la dysplasie tubaire génétique d'un point de vue morphologique et immunohistochimique.

**Ref.: Ms. No. GYOBFE-D-10-00126R2**

**N'oubliez pas les trompes! Une étude morphologique et  
immunohistochimique des trompes à risque génétique  
Gynécologie Obstétrique & Fertilité**

**Cher Monsieur,**

**Nous avons le plaisir de vous annoncer que votre article a été accepté par le  
comité et paraîtra dans un prochain numéro de la revue.**

**Vous trouverez ci-dessous les commentaires du comité de rédaction et des  
lecteurs.**

**Nous vous remercions vivement de votre précieuse collaboration.**

**Avec nos meilleures salutations,**

**Gaëlle Cauvin**

**Rédaction**

**Gynécologie Obstétrique & Fertilité**

-----

**Commentaires du comité de rédaction et des lecteurs :**

**Reviewer #2: Les remarques (minimes) ont été prises en compte.**

**Le papier mérite publication.**



**N'oubliez pas les trompes ! Une étude morphologique et immunohistochimique des trompes à risque génétique (mutation BRCA)**

**Don't forget fallopian tubes ! A morphologic and immunohistochemical study about fallopian tubes with genetic risk (BRCA mutation)**

**Titre court: mutations génétiques BRCA et trompes de Fallope**  
**BRCA mutations and Fallopian tubes**

G. Chene<sup>1,2,3</sup>, J. Dauplat<sup>2</sup>, I. Raoelfils<sup>1</sup>, Y-J. Bignon<sup>4</sup>, A. Cayre<sup>1</sup>, P. Jaffeux<sup>5</sup>, B. Aublet-Cuvelier<sup>5</sup>, F. Penault-Llorca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département d'Anatomopathologie, Centre Jean Perrin, 63000 Clermont-Ferrand.

<sup>2</sup>Département de Chirurgie, Centre Jean Perrin, 63000 Clermont-Ferrand.

<sup>3</sup>Département de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpital Nord, 42000 Saint Etienne; Université de Saint Etienne Jean Monnet, F-42023, Saint Etienne, France.

<sup>4</sup>Département d'Oncologie Moléculaire, Centre Jean Perrin, 63000 Clermont-Ferrand.

<sup>5</sup>Département d'Informations Médicales, Hôpital Gabriel Montpied, 63000 Clermont-Ferrand.

Auteur correspondant:

Gautier Chene, MD

Centre Jean Perrin, Bvd Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand

France

Tel: +33-6-07-08-17-86; Fax: +33-4-77-82-89-56 ; Email: [chenegautier@yahoo.fr](mailto:chenegautier@yahoo.fr)

**Objectifs :** L'objectif de cette étude est de décrire le profil morphologique et immunohistochimique des anomalies pré-néoplasiques tubaires à risque génétique.

**Patientes et Méthodes :** l'analyse morphologique (à l'aide d'une échelle originale comportant 7 critères histopathologiques) et l'expression immunohistochimique (p53 et Ki67) de 57 salpingectomies prophylactiques (groupe A) et de 90 témoins (groupe B) ont été comparées. Toutes les lames ont été lues en insu par deux pathologistes spécialisés en oncogynécologie.

**Résultats :** Des anomalies tubaires dénommées lésions tubaires intra-épithéliales et séreuses (STIL) ont été mises en évidence dans le groupe A avec une sur-expression de p53 et de Ki67. Le statut BRCA 1 confèrait une fréquence accrue de STIL et d'accumulation p53.

**Discussion et Conclusion :** La présence d'anomalies morphologiques et le profil immunohistochimique justifient la salpingectomie prophylactique et ouvrent de nouvelles perspectives d'étude de la cancérogenèse ovarienne.

**Objectives :** The objective of this study was to describe morphologic and immunohistochemical features of precursor tubal lesions in prophylactically removed Fallopian tubes.

**Patients & Methods :** 147 bilateral oophorectomies (genetic predisposition or group A: n=57 ; and control group or group B: n=90) were reviewed by two pathologists blinded to clinical data. Seven epithelial cytological and architectural features were studied to compare the degree of tubal epithelial abnormalities between the two groups. Immunohistochemical expression patterns of Ki67 and p53 were also evaluated.

**Results :** Serous tubal intraepithelial lesions (STIL) have been identified in group A with stronger expression for Ki67 and p53 (especially in BRCA 1 group) than in group B.

**Discussion and Conclusion:** The current results show the importance of salpingo-oophorectomy in BRCA mutation carriers and the complete histopathological sampling of the fallopian tubes.

Mots clés : BRCA; annexectomie prophylactique ; cancer de l'ovaire ; cancer tubaire ; p53

Key words: BRCA; prophylactic salpingo-oophorectomy ; ovarian cancer; Fallopian tube neoplasms; p53

### **Introduction :**

Le cancer tubaire est rare, représentant seulement 0.3% des cancers gynécologiques [1].

Pourtant, l'analyse histopathologique méticuleuse et exhaustive des pièces d'annexectomie prophylactique pour risque génétique (mutation BRCA 1 et 2) a pu révéler jusqu'à 10% de cancers occultes, dont 57% à 100% étaient localisés au niveau de la portion distale des trompes (cancers séreux intraépithéliale tubaire ou « STIC »). Parallèlement et à la lumière de ces constatations, plusieurs séries de cancers ovariens sporadiques (sans mutation BRCA) ont été à nouveau analysés et la présence d'anomalies tubaires a été mise en évidence dans près de 50% des cas [2-9].

L'hypothèse de l'origine tubaire dans le cancer de l'ovaire a ainsi été proposée [10-12].

Nous proposons de rechercher de telles anomalies tubaires (dénommées lésions tubaires intra-épithéliales et séreuses ou « STIL ») [13] à partir d'une série de salpingectomies prophylactiques comparée à des salpingectomies témoins et en nous basant sur une échelle d'évaluation originale. Nous décrirons également l'apport immunohistochimique de deux marqueurs, p53 et Ki67, afin de mieux caractériser ces anomalies tubaires.

## **Matériel & Méthode :**

### **1- Patientes :**

A partir d'une base de données regroupant 1600 annexectomies réalisées entre janvier 1990 et décembre 2005, nous avons sélectionné deux groupes de patientes :

- Groupe A : Salpingectomies provenant de pièces d'annexectomies prophylactiques pour risque génétique (mutation BRCA 1 ou 2) ou antécédents familiaux importants de néoplasie sein/ovaires (ATCD) définis de la manière suivante : 1/ au moins un cancer de l'ovaire familial au 1<sup>er</sup> degré et au moins un cancer du sein familial au 1<sup>er</sup> ou 2<sup>ème</sup> degré et/ou un cancer personnel du sein, ou 2/ au moins deux cancers du sein familiaux au 1<sup>er</sup> ou 2<sup>ème</sup> degré et un antécédent personnel de cancer du sein, et 3/ recherche négative des mutations BRCA 1 et 2. Les cas de pathologie infectieuse, de cancer tubaires et/ou ovarien associés étaient exclus.
- Groupe B ou groupe témoin: Salpingectomies provenant de pièces d'annexectomies chez un groupe témoin spontanément fertile et sans antécédent personnels ou familiaux de cancers gynécologiques (sein, ovaire, endomètre) et dont l'examen histopathologique concluait à des trompes dénuées de pathologie infectieuse, cancéreuse ou borderline.



## **2- Critères histopathologiques :**

### **A- analyse morphologique :**

Notre définition d'anomalies tubaires (lésions tubaires intraépithéliales et séreuses ou « STIL ») se base sur les données de la littérature à partir de laquelle nous avons construit une échelle d'évaluation semi-quantitative comprenant deux niveaux de gravité et sept critères histopathologiques [13-16]:

- pseudostratification épithéliale
- présence de touffes
- augmentation de la densité nucléaire
- présence d'atypies nucléaires
- dédifférentiation
- augmentation de la taille nucléaire
- perte de la ciliation

Dans chaque cas, la zone la plus anormale était cotée de 0 à 2 (0=normal, 1=modérément anormal, 2=sévèrement anormal).

Un score moyen (dénommé score STIL) pour chaque patiente était simplement obtenu en ajoutant les niveaux de chacun des 7 items (0 à 14).

La justification et la validation de cette échelle seront expliquées dans la discussion.

Les lames histopathologiques des trompes des groupes A et B ont toutes été relues en insu par deux pathologistes experts en onco-gynécologie. Quand plusieurs lames étaient disponibles, celle présentant le score le plus élevé était retenue. En cas de divergence manifeste entre les

scores établis par chaque pathologiste, une nouvelle lecture collégiale était réalisée afin d'obtenir un consensus.

### **B- Analyse immunohistochimique :**

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur coupes en paraffine pour les anticorps anti-p53 (DO-7, DAKO, Dilution 1/200) et Ki67 (MIB-1, DAKO, Dilution 1/100) en suivant les recommandations des fabricants.

L'évaluation immunohistochimique a été réalisée grâce à la détermination d'un score immunoréactif (IRS) développé et utilisée pour l'étude des dysplasies ovariennes [17]: ce score quantitatif IRS est défini comme le produit de l'intensité du marquage (de 0 à 3) et du pourcentage de cellules marquées (de 0 à 4). Ce score s'étend donc de 0 à 12.

### **3- analyse statistique :**

En ce qui concerne l'analyse morphologique, les scores STIL ont été comparés à l'aide du test de Student. Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour la comparaison des scores IRS.

Une différence était considérée comme statistiquement significative pour  $p < 0.05$ .

## **Résultats :**

Le groupe A comprenait 57 cas (25 mutations BRCA 1, 11 mutations BRCA2 et 21 ATCD familiaux sans mutations associées). La population témoin comportait 90 patientes (photo 1).

Les données démographiques sont rappelées dans le tableau n°1.

A l'exception des touffes, les anomalies histopathologiques du groupe des salpingectomies étaient présentes dans plus de la moitié des cas.

Les anomalies étaient toujours plus marquées au niveau des trompes avec mutation BRCA (photos 2 et 3).

Inversement, les anomalies histopathologiques chez les témoins étaient rares, sauf pour la pseudostratification épithéliale présente dans 48,9% des cas (tableau 2)

A partir de ces données, un score STIL pour chaque groupe a été calculé en faisant la moyenne du score STIL de chaque patiente. Le score STIL des salpingectomies prophylactiques a été évalué à  $6.76 \pm 2.7$ , alors que le score STIL du groupe témoin était de  $1.37 \pm 1.3$ , la différence étant statistiquement significative ( $p < 0.0001$ ).

La distinction entre mutation BRCA 1 ( $7.82 \pm 2.97$ ), BRCA 2 ( $6 \pm 3.3$ ) et Antécédents ( $5.82 \pm 2.69$ ) retrouvait une gradation plus sévère en cas de mutation BRCA.

En ce qui concerne l'analyse immunohistochimique, le score IRS du marqueur Ki67 du groupe A a été évalué à  $1.23 \pm 0.8$  contre  $0.17 \pm 0.3$  pour le groupe B (photo 4). Pour le p53, le score IRS du groupe A s'élevait à  $1.70 \pm 1.4$  contre  $0.28 \pm 0.25$  pour les témoins (photo 5). Pour les deux types de marqueurs, la différence était statistiquement significative (respectivement  $p < 0.001$  pour le Ki67 et  $p < 0.0001$  pour le p53). L'analyse en sous-groupe

pour ces deux marqueurs retrouvait un score IRS plus important en cas de mutation BRCA.

L'ensemble des données immunohistochimiques est présenté dans le tableau n°3.

## **Discussion :**

La pathogénie du cancer de l'ovaire reste méconnue du fait de l'absence de marqueurs ou de lésions précoces identifiables. L'annexectomie prophylactique pour risque génétique est à ce jour la seule méthode préventive efficace avec une réduction du risque de cancer de plus de 90% [18]. Elle constitue aussi une aide inestimable pour la compréhension et l'étude des étapes préliminaires de cancérogenèse ovarienne : des anomalies ovariennes précoces qualifiées de dysplasie pré-cancéreuse ont en effet pu être mises en évidence [19, 20].

L'étude histopathologique tubaire est apparue plus tardivement car les théories de carcinogénèse ovarienne s'appuyaient initialement sur l'ovaire (théorie de l'ovulation incessante [21], théories hormonales [18]). Or, et de façon surprenante, de véritables lésions cancéreuses intraépithéliales tubaires occultes (carcinomes tubaires intraépithéliales et séreux de haut grade ou « STIC ») ont été rapportées avec une fréquence inhabituelle au niveau de la partie distale des trompes issues de pièces d'annexectomie prophylactique, ce qui a incité l'étude systématique et exhaustive de ces trompes [2-9]. Des lésions tubaires intraépithéliales et séreuses ou « STIL » [13], encore appelées TILT pour certains auteurs (lésions tubaires intraépithéliales en transition) [9] ont ainsi été décrites sous forme d'un ensemble d'anomalies tubaires allant de l'épithélium d'allure normale à des lésions atypiques ou encore dysplasiques sans atteindre le stade de cancer in situ. Le dénominateur commun de ces lésions précoces étant la sur-expression de p53.

Cependant, il n'y a pas encore de définition précise et validée de ces critères morphologiques, ce qui impose de les déterminer et d'autre part de les comparer avec un groupe témoin sans facteur de risque cancéreux.

C'est pourquoi, en nous basant sur les données de la littérature, nous avons établi une échelle d'évaluation morphologique semi-quantitative avec sept anomalies cytologiques ou architecturales (qui ne sont aucunement pathologiques prises individuellement) et deux



niveaux de sévérité [13-16]. L'existence d'un score STIL statistiquement significatif dans le groupe A par rapport au groupe B avec de surcroît une gradation dans le sous-groupe BRCA confirmerait ainsi cette notion de STIL. Par ailleurs, l'association avec une sur-expression du p53 constitue un argument essentiel comme l'ont démontré les études de Crum *et al* [2-9]. Effectivement, les STIC sont généralement positifs pour le p53 et montrent le plus souvent un index de prolifération élevé (sur-expression du Ki 67). Les travaux de Crum *et al* ont démontré l'accumulation de p53 au niveau de l'épithélium tubaire non cancéreux (STIL) issu de pièces d'annexectomie prophylactiques, dénommée « signature p53 ». La sur-expression du p53 serait prédominante au niveau des cellules sécrétoires non ciliées de la partie distale de la trompe. Nous retrouvons d'ailleurs une fréquence élevée de perte de la ciliation (56.1% dans le groupe A dont 77.8% dans le sous-groupe BRCA) dans notre série. Parallèlement, l'index de prolifération Ki67 significatif dans le groupe A constitue un argument supplémentaire : l'épithélium tubaire n'est plus complètement normal sans être encore au stade de cancer.

Le schéma de cancérogenèse proposé serait ensuite l'apparition d'altérations génomiques et d'expansion clonale, évolution vers le STIC, puis atteinte ovarienne et péritonéale par contiguïté et ou exfoliation.

Pourtant si la signature moléculaire p53 semble à l'évidence précoce, il n'est pas évident que ce soit l'événement le plus précoce : la série de salpingectomies prophylactiques de Carcangiu *et al* [13] ne retrouve pas de marquage p53 en dehors des cancers in situ. Pour Piek *et al* [16], p53 est exprimé uniquement au niveau des lésions STIL dysplasiques et atypiques déjà évoluées, et absente au niveau des autres lésions d'apparence morphologique moins avancées. Nous faisons le même constat : les cas porteurs d'atypies nucléaires (54.4%) sont plus volontiers associés à la présence de p53.

Notre département est d'ailleurs en train d'étudier d'autres marqueurs qui seraient plus spécifiques et représentatifs des STIL.

Quoiqu'il en soit, la salpingectomie doit être associée à l'ovariectomie prophylactique chez les patientes à risque. L'analyse anatomopathologique doit être la plus complète possible en multipliant le nombre de coupes à la recherche d'un cancer occulte et devrait probablement intégrer une analyse immunohistochimique avec notamment le p53 et éventuellement d'autres marqueurs plus spécifiques qui restent à définir.



### **Conclusion :**

Les modifications morphologiques et immunohistochimiques tubaires pourraient faire parties des stades précoces de la cancérogenèse ovarienne. Pour autant, des résultats similaires ont été mis en évidence sur les pièces d'ovariectomie prophylactique pour risque génétique avec une immunoréactivité croissante pour le Ki67 et le p53 entre des ovaires dysplasiques (en particulier au niveau des kystes d'inclusion et des invaginations profondes) et d'authentiques cancers séreux ovariens de haut grade [17].

Cette nouvelle voie tubaire n'élimine pas pour l'instant les anciennes théories ovariennes de carcinogenèse et incite à poursuivre les études ainsi qu'à comparer et corrélérer les aspects morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires des ovaires et des trompes [22, 23].

**Conflit d'intérêt : Aucun**

**Légendes :**

*Tableau 1 : Caractéristiques du groupe A salpingectomies prophylactiques (N=57) et du groupe B témoin (N=90)*

*Tableau 2 : Distribution des anomalies histopathologiques dans le groupe A salpingectomies prophylactiques (N= 57) et B témoins (N=90). Dans la colonne du groupe A salpingectomies prophylactiques, les résultats en fonction du statut BRCA sont également donnés (mutations BRCA , n= 36; antécédents familiaux importants sans mutation BRCA, n= 21).*

*Tableau 3 : Scores IRS Ki67 et p53. En jaune, différence statistiquement significative*

*Iconographie :*

*Photo 1 : épithélium tubaire normal , HES x20. Remarquez la présence des cils à la surface des cellules épithéliales.*

*Photo 2 : formation de touffes, HES x 20*

*Photo 3 : atypies nucléaires, HES x 20*

*Photo 4 : sur-expression Ki67, x 10*

*Photo 5 : sur-expression p53, x 20*

## **Bibliographie :**

- 1/ Baekelandt M, Kock M, Wesling F, Gerris J. Primary adenocarcinoma of the fallopian tube. Review of the literature. *Int J Gynecol Cancer* 1993; 3: 65-71
- 2/ Folkins AK, Jarboe EA, Saleemuddin A, Lee Y, Callahan MJ, Drapkin R, Garber JE, Muto MG, Tworoger S, Crum CP. A candidate precursor to pelvic serous cancer (p53 signature) and their prevalence in ovaries and fallopian tubes from women with BRCA mutations. *Gynecol oncol* 2008; 109: 168-73
- 3/ Crum CP, Drapkin R, Kindelberger D, Medeiros F, Miron F, Lee Y. Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clin Med Res* 2007; 5 (1): 35-44
- 4/ Powell CB, Kenley E, Chen LM, Crawford B, McLennan J, Zaloudek C, Komaromy M, Beattie M, Ziegler J. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA mutation carriers : role of serial sectioning in the detection of occult malignancy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 127-32
- 5/ Finch A, Shaw P, Rosen B, Murphy J, Narod SA, Colgan TJ. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 58-64
- 6/ Callahan MJ, Crum CP, Medeiros F, Kindelberger DW, Elvin JA, Garber JE, Feltmate CM, Berkowitz RS, Muto MG. Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *J Clin oncol.* 2007; 25: 3985-90
- 7/ Leeper K, Garcia R, Swisher E, Goff B, Greer B, Paley P. Pathologic findings in prophylactic oophorectomy specimens in high-risk women. *Gynecol oncol* 2002; 87: 52-6

- 8/ Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, Garber JE, Cramer DW, Crum CP. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 230-6
- 9/ Crum CP. Intercepting pelvic cancer in the distal fallopian tube : Theories and realities. *Mol Oncol* 2009 ; 3 : 165-70
- 10/ Landen CN, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 995-1005
- 11/ Kurman RJ, Ming-Shih I. Pathogenesis of ovarian cancer. Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27 (2): 151-60
- 12/ Ming-Shih I, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis. A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164: 1511-18
- 13/ Gross AL, Kurman RJ, Vang R, Shih IM, Visvanathan K. Precursor lesions of high-grade serous ovarian carcinoma: morphological and molecular characteristics. *J Oncol* 2010
- 14/ Atypical epithelial proliferation in Fallopian tubes in prophylactic salpingo-oophorectomy specimens from BRCA 1 and BRCA 2 germline mutation carriers. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 23: 35-40.
- 15/ Yanai-Inbar I, Siriaunkgul S, Silverberg SG. Mucosal epithelial proliferation of the fallopian tube: a particular association with ovarian serous tumor of low malignant potential? *Int J Gynecol Pathol* 1995; 14: 107-13.
- 16/ Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP. Dysplastic changes in prophylactic removed fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol* 2001 2001 ; 195 : 451-6.
- 17/ Schloosshauer PW, Cohen CJ, Penault-Llorca F, Miranda CR, Bignon YJ, Dauplat J, Deligdisch L. Prophylactic oophorectomy. *Cancer* 2003; 98: 2599-606.

- 18/ Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Mishellany F, Dauplat MM, Tardieu AS, Pomel C, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly J, Dechelotte P, Dauplat J. Ovarian epithelial dysplasia: myth or reality? Review. *Gynecol Obstet Fertil*, 2008; 36: 800-807.
- 19/ Deligdisch L, Gil J, Kerner H, Wu HS, Beck D, Gershoni-Baruch R. Ovarian dysplasia in prophylactic oophorectomy specimens. *Cancer* 1999; 86: 1544-50.
- 20/ Chene G, Penault-Llorca F, Le Bouedec G, Mishellany F, Dauplat MM, Jaffeux P, Aublet-Cuvelier B, Pouly J, Dechelotte P, Dauplat J. Ovarian epithelial dysplasia and prophylactic oophorectomy for genetic risk. *Int J Gynecol Cancer*, 2009; 19: 65-72.
- 21/ Fathalla M. Incessant ovulation : a factor in ovarian neoplasia ? *Lancet* 1971; 2: 163.
- 22/ Fleming JS, Beaufie CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Molecular and cellular endocrinology*, 2006; 247: 4-21.
- 23/ Leunen K, Legius E, Moerman P, Amant F, Neven P, Vergote I. Prophylactic salpingo-oophorectomy in 51 women with familial breast-ovarian cancer : importance of fallopian tube dysplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006 ; 16 : 183-88.

Variables \ Groupes	Salpingectomies prophylactiques N= 57	Témoins N=90
Age	49,2+/-6,8 (37-63)	47,8+/-5,5 (32-61)
Parité	1,7+/-1,0 (0-4)	2,2+/-1,0 (0-5)
Contraception orale		
Oui	31 (54,4%)	78 (86,7%)
Durée (mois)	62,2+/-24,7	54,1+/-22,8

*Tableau 1 : Caractéristiques du groupe A salpingectomies prophylactiques (N=57) et du groupe B témoin (N=90)*

Critères histopathologiques	Salpingectomies prophylactiques N= 57 (%) N <sup>†</sup> BRCA+ = 36 N <sup>†</sup> BRCA- = 21	Témoins N= 90 (%)
pseudostratification épithéliale	38 (66,7%) BRCA+ : 29 (80,5%) BRCA - : 9 (42,8%)	44 (48,9%)
Touffes	20 (35,1%) BRCA + : 17 (47,2%) BRCA - : 3 (14,3%)	11 (12,2%)
Densité nucléaire	35 (61,4%) BRCA + : 26 (72,2%) BRCA - : 9 (42,8%)	27 (30%)
Atypies nucléaires	31 (54,4%) BRCA + : 24 (66,7%) BRCA - : 7 (33,3%)	8 (8,9%)
dédifférentiation	31 (54,4%) BRCA + : 25 (69,4%) BRCA - : 6 (28,6%)	19 (21,1%)
Taille nucléaire	30 (52,6%) BRCA + : 25 (69,4%) BRCA - : 5 (23,8%)	10 (11,1%)
Perte ciliation	32 (56,1%) BRCA + : 28 (77,8%) BRCA - : 4 (19%)	8 (8,9%)

Tableau 2 : Distribution des anomalies histopathologiques dans le groupe A salpingectomies prophylactiques (N= 57) et B témoins (N=90). Dans la colonne du groupe A salpingectomies prophylactiques, les résultats en fonction du statut BRCA sont également donnés (mutations BRCA , n= 36; antécédents familiaux importants sans mutation BRCA, n= 21).

Score IRS Ki67	1 <sup>er</sup> Groupe	2 <sup>ème</sup> Groupe	p
Groupe A versus groupe B	1.23+/-0.8	0.17+/-0.3	<.001
B1 versus B2	1.79+/-1.66	0.72+/-0.64	0.003
B1 versus ATCD	1.79+/-1.66	0.38+/-0.49	<.0001
B2 versus ATCD	0.72+/-0.64	0.38+/-0.49	0.30

Score IRS p53	1 <sup>er</sup> Groupe	2 <sup>ème</sup> Groupe	p
Groupe A versus groupe B	1.7+/-1.4	0.28+/-0.25	<.0001
B1 versus B2	2.45+/-1.66	1.63+/-1.12	0.19
B1 versus ATCD	2.45+/-1.66	1.14+/-1.38	0.006
B2 versus ATCD	1.63+/-1.12	1.14+/-1.38	0.28

Tableau 3 : Scores IRS Ki67 et p53. En jaune, différence statistiquement significative